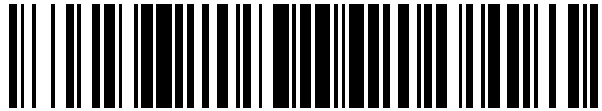


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 602**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
C07H 21/04	(2006.01)		
C12N 15/00	(2006.01)		
C12Q 1/68	(2006.01)		
C07K 17/00	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
C07K 16/32	(2006.01)		
C07K 16/44	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2006 E 12171813 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2573114**

54 Título: **Identificación y modificación de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de uso de estos**

30 Prioridad:

10.08.2005 US 707419 P

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

12.08.2016

73 Titular/es:

**MACROGENICS, INC. (100.0%)
9640 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**STAVENHAGEN, JEFFERY;
GORLATOV, SERGEY;
RANKIN, CHRISTOPHER y
TUAILLON, NADINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 579 602 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

Identificación y modificación de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de uso de estos

1. Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con moléculas, particularmente polipéptidos, más particularmente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre. Las moléculas de la invención son particularmente útiles al impedir, tratar, o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno donde se desea una eficacia mejorada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, y para mejorar la eficacia terapéutica de los anticuerpos terapéuticos cuyo efecto se media por ADCC.

2. Antecedentes de la invención

15 2.1 Receptores Fc y su papel en el sistema inmunológico

La interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con las células del sistema inmunológico resulta en una amplia matriz de respuestas, que van desde funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos, y fagocitosis a señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunológicos a receptores especializados de superficie celular en las células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunológicos resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores Fc. Los receptores Fc comparten dominios de unión de ligando estructuralmente relacionados que median presumiblemente la señalización intracelular.

25 Los receptores de Fc, miembros de la superfamilia de proteínas de genes de inmunoglobulina, son glicoproteínas de superficie que pueden unir la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor Fc. Los receptores Fc se definen por su especificidad para los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se denominan como FcγR, para IgE como FεR, y para IgA como FcαR. Diferentes células accesorias portan receptores Fc para anticuerpos de isotipo diferente, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias participarán en una respuesta determinada (revisado por Ravetch J.V. y otros 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. y otros 2001 Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. y otros 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. y otros 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J. V. y otros, 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores Fc, las células que los expresan, y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptado de humunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ta edición 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores Fcγ

40 Cada miembro de esta familia es una glicoproteína de membrana integral, que posee los dominios extracelulares relacionados a un conjunto C2 de dominios relacionados con la inmunoglobulina, un único dominio de inmunoadsorción de membrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen tres FcγRs conocidos, designados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), y FcγRIII(CD16). Los tres receptores se codifican por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que provinieron de un progenitor común quizás por la duplicación de genes.

FcγRII(CD32)

45 Las proteínas FcγRII son glicoproteínas integrales de membrana de 40 KDa que se unen sólo la IgG complejada debido a una baja afinidad por el Ig monomérico Ig ($10^6 M^{-1}$). Este receptor FcγR es el más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, que incluyen monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII tiene sólo dos regiones similares a inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y de ahí una afinidad mucho menor por IgG que FcγRI. Existen tres genes FcγRII humanos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales unen IgG en agregados o complejos inmunológicos.

Las diferencias distintas dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas para la ligación de los receptores. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tales como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia las señales inhibitoras, por ejemplo, inhibición de la activación de células B.

5 Señalización a través de FcγRs

Tanto las señales de activación como inhibitoras se transducen a través de los FcγRs a continuación de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamado motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAMs) o motivos inhibitorios inmunorreceptores basados en tirosina (ITIMS) justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contiene ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIAA, mientras que los complejos que contienen ITIM solamente incluyen FcγRIIB.

15 Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación FcγRIIA a través de complejos inmunológicos o reticulación de anticuerpo específico sirve para agregar ITAMs junto con las quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación resulta en la activación de sustratos intermedios (por ejemplo, PI3K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

20 El gen FcγRIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es 96 % idéntico a FcγRIIA y une complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclase inhibitora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se liga junto con un activador FcγR, el ITIM en FcγRIIB se vuelve fosforilado y atrae el dominio SH2 del inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza mensajeros fosfoinositol liberados como una consecuencia de la activación de la tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, impidiendo de este modo la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Así, la reticulación de FcγRIIB hace perder la respuesta de activación a la ligación de FcγR e inhibe la respuesta celular. La activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos así se interrumpe.

30 Shields y otros (2001), J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604, trata de determinar el sitio de unión en la IgG1 humana por los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y FcRn y describen las variantes de IgG1 seleccionadas y las afinidades de unión de estas. La WO 04/063351 A2 (MacroGenics, Inc.; Stavenhagen y otros) describe las moléculas que comprenden variantes particulares de la región Fc, que une FcγRIIA y/o FcγRIIAA con mayor afinidad en relación con moléculas comparables que comprenden la región Fc tipo silvestre. La WO 00/42072 A2 (Genentech, Inc.) describe polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes específicas y sus efectos sobre la afinidad de unión y función efectora. Stavenhagen y otros (2007), Cancer Res. 67(18):8882-8890, divulgan dominios Fc particulares y sus afinidades de enlazamiento a los receptores Fc CD16A y CD32B. La WO 04/099249 A2 (Xencor Inc.) divulga variantes de Fc específicos, métodos para su generación, y anticuerpos y proteínas de fusión Fc que incluyen las variantes específicas.

TABLA 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina

Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
Unión	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 5 x 10 ⁸ M ⁻¹	IgE 10 ¹⁰ M ⁻¹	IgA1, IgA2 10 ⁷ M ⁻¹
Tipo celular	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas células de Langerhan	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Células B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
Efecto de Ligación	Captación Estimulación Activación de estallido respiratorio Inducción de la muerte.	Captación Liberación de gránulo	Captación Inhibición de la estimulación	No Captación Inhibición de la estimulación	Inducción de la Muerte	Secreción de gránulos	Captación Inducción de la muerte

2.2 Enfermedades de relevancia

2.2.1 Cáncer

Una neoplasia o tumor es una masa neoplásica que resulta del crecimiento celular anormal descontrolado que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligna" generalmente significa que el tumor puede invadir y destruir las estructuras del cuerpo vecinas y propagarse a sitios distantes para causar la muerte (para revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2da Edición, W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y se comporta de manera diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en que se originan y después se propagan a otra(s) parte(s) del cuerpo donde comienzan un nuevo crecimiento y causan más destrucción.

Más de 1.2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y si las tendencias actuales continúan se espera que sea el cáncer la causa principal de la muerte en el año 2010. El cáncer de pulmón y próstata son los máximos cancerígenos para los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y mama son los máximos cancerígenos para las mujeres en los Estados Unidos. Uno de cada dos hombres en los Estados Unidos serán diagnosticados con cáncer en algún momento durante su vida. Uno de cada tres mujeres en los Estados Unidos serán diagnosticadas con cáncer en algún momento durante su vida.

Una cura para el cáncer aún no se ha encontrado. Las opciones terapéuticas actuales, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación, son muchas veces ya sea ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

20 Terapia contra el cáncer

En la actualidad, la terapia contra el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para destruir las células neoplásicas en un paciente (Véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, editores, Capítulo 12, Sección IV). Recientemente, la terapia del cáncer también puede implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todos estos enfoques plantean inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, se puede contraindicar debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Además, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La radioterapia es eficaz solamente cuando el tejido neoplásico exhibe una mayor sensibilidad a la radiación que los tejidos normales, y la radioterapia puede provocar además efectos secundarios frecuentemente graves. La terapia hormonal se da raramente como un agente único y, aunque puede ser eficaz, se usa frecuentemente para impedir o retrasar la recurrencia de cáncer después de que otros tratamientos han eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias se limitan en número y pueden producir efectos secundarios tales como erupciones o inflamaciones, síntomas parecidos a la gripe, que incluyen fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo o reacciones alérgicas.

Con respecto a la quimioterapia, existen una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento de cáncer. Una mayoría significativa de agentes quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, ya sea directamente, o indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótido trifosfato, para impedir la replicación del ADN y la división celular concomitante (Véase, por ejemplo, Gilman y otros, Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Octava Edición (Pergamom Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, anti-metabolitos, tales como metotrexato e hidroxiurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, etc., aunque no son necesariamente específicos al ciclo celular, destruyen células durante la fase S debido a su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente colchicina y los alcaloides vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el ensamblaje de microtúbulos resultando en la detención mitótica. Generalmente los protocolos de quimioterapia implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para aumentar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia tiene muchos inconvenientes (Véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, editores, cap. 12, sect. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia causa efectos secundarios significativos, y frecuentemente peligrosos, que incluyen náusea severa, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. Además, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, las células resistentes a los agentes quimioterapéuticos particulares usados en el protocolo de tratamiento frecuentemente resultan ser resistentes a otros fármacos, incluso aquellos agentes que actúan por mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos usados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina resistencia pleiotrópica del fármaco o

múltiples fármacos. Así, debido a la resistencia a los fármacos, muchos cánceres resultan refractarios a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

5 Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos para el cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer que ha demostrado ser refractario a los tratamientos estándar contra el cáncer, tal como la cirugía, radioterapia, quimioterapia, y terapia hormonal. Una alternativa prometedora es la inmunoterapia, en los que las células cancerosas se dirigen específicamente por anticuerpos específicos a antígeno de cáncer. Los esfuerzos principales se han dirigido a aprovechar la especificidad de la respuesta inmunológica, por ejemplo, la tecnología de hibridomas ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos al tumor (Véase Green M.C. y otros, 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51), y en los últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos ha aprobado los primeros MABs para la terapia contra el cáncer: Rituxin (anti-CD20) para el linfoma no Hodgkin y Herceptin [anti-(c-erb-2/HER-2)] para el cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora de los anticuerpos, por ejemplo, para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC") es un obstáculo para tal tratamiento. Se necesitan así métodos para mejorar la eficacia de dicha inmunoterapia.

15 2.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes

La inflamación es un proceso por el cual los glóbulos blancos del cuerpo y sustancias químicas protegen nuestro cuerpo de la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Por lo general se caracteriza por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento de la zona afectada. Las sustancias químicas conocidas como citoquinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada auto-limitante y ordenada en la sangre o tejidos afectados. Esta liberación de sustancias químicas aumenta el flujo de sangre al área de lesión o infección, y puede resultar en enrojecimiento y calor. Algunas de las sustancias químicas causan una fuga de líquido en los tejidos, resultando en la inflamación. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un período limitado en el área relevante, trabajan para el beneficio del cuerpo.

25 En los trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, el sistema inmunológico desencadena una respuesta inflamatoria cuando no existen sustancias extrañas para combatir y normalmente el sistema inmunológico protector del cuerpo causa daño a sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se afecta en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se afecta en individuos con enfermedad de Crohn y la membrana sinovial, hueso y cartílago de diversas articulaciones se afectan en individuos con artritis reumatoide. Cuando los trastornos autoinmunitarios progresan, pueden resultar en la destrucción de uno o más tipos de tejidos del cuerpo, crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar a un solo órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen las células rojas de la sangre, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o páncreas), músculos, articulaciones, y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitarse a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de oído interior, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerativa.

40 La artritis reumatoide (RA) y artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. La artritis es un término general que describe la inflamación en las articulaciones. Algunos, pero no todos, los tipos de artritis son el resultado de la inflamación mal dirigida. Además de la artritis reumatoide, otros tipos de artritis asociada con la inflamación incluyen los siguientes: artritis psoriásica, síndrome de Reiter, artritis por espondilitis anquilosante, y artritis gotosa. La artritis reumatoide es un tipo de artritis crónica que ocurre en las articulaciones en ambos lados del cuerpo (tales como ambas manos, muñecas o rodillas). Esta simetría ayuda a distinguir la artritis reumatoide de otros tipos de artritis. Además de afectar a las articulaciones, la artritis reumatoide puede ocasionalmente afectar la piel, ojos, pulmones, corazón, sangre o nervios.

50 La artritis reumatoide afecta aproximadamente 1 % de la población mundial y es potencialmente incapacitante. Existen aproximadamente 2.9 millones de incidencias de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Se afectan de dos a tres veces más mujeres que hombres. La edad típica que ocurre la artritis reumatoide es entre 25 y 50 años. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71,000 jóvenes norteamericanos (de dieciocho años y menores), afectando seis veces más a las chicas que a los chicos.

55 La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria donde el sistema inmunológico del cuerpo identifica inadecuadamente las membranas sinoviales que secretan el líquido lubricante en las articulaciones como extraño. La inflamación resulta, y el cartílago y tejidos dentro y alrededor de las articulaciones se dañan o destruyen. En

5 casos severos, esta inflamación se extiende al cartílago circundante y otros tejidos de la articulación, donde se puede erosionar o destruir el hueso y cartílago y conducir a deformidades de la articulación. El cuerpo sustituye el tejido dañado por tejido cicatrizal, que causan estrecharse los espacios normales dentro de las articulaciones y fusionar conjuntamente los huesos. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchamiento, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre, y con frecuencia, dolor paralizante. Algunos de los síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez en las articulaciones al despertar que dura una hora o más; hinchamiento en las articulaciones de un dedo específico o muñeca; hinchamiento de los tejidos blandos alrededor de las articulaciones; e hinchamiento en ambos lados de la articulación. El hinchamiento puede ocurrir con o sin dolor, y puede empeorar de forma progresiva o permanecer igual durante años antes de progresar.

10 El diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, que incluyen: la localización específica y la simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez de las articulaciones en la mañana, la presencia de protuberancias y nódulos debajo de la piel (nódulos reumatoides), resultados de pruebas de rayos X que sugieren la artritis reumatoide, y/o los resultados positivos de una prueba de sangre llamada factor reumatoide. Muchos, pero no todas, las personas con artritis reumatoide tienen el anticuerpo del factor reumatoide en su sangre.

15 El factor reumatoide puede estar presente en las personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades pueden causar además que se produzca en la sangre el factor reumatoide. Es por eso que el diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no sólo la presencia del factor reumatoide en la sangre.

20 El curso típico de la enfermedad es uno de los síntomas articulares persistentes pero fluctuantes, y después de aproximadamente 10 años, 90 % de los enfermos mostrarán daños estructurales al hueso y cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una corta enfermedad que desaparece por completo, y otro porcentaje pequeño tendrá enfermedad muy severa con muchas deformidades de las articulaciones, y ocasionalmente otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio causa erosión o destrucción del hueso y cartílago en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existen un ciclo autoinmunitario de presentación persistente del antígeno, estimulación de las células T, secreción de citoquinas, activación de las células sinoviales, y destrucción de la articulación.

25 La enfermedad tiene un gran impacto tanto en el individuo como la sociedad, causando dolor significativo, deterioro de la función y discapacidad, así como costando millones de dólares en gastos de atención médica y pérdidas salariales. (Véase, por ejemplo el sitio web de NIH y el sitio web de NIAID).

30 La terapia actualmente disponible para la artritis se centra en la reducción de la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis son generalmente los anti-inflamatorios, tales como la aspirina, el ibuprofeno y Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los "fármacos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten con solo estas líneas de tratamiento. Los recientes avances en la comprensión de la patogénesis de la artritis reumatoide han conducido al uso de metotrexato en conjunto con anticuerpos para citoquinas o receptores recombinantes solubles. Por ejemplo, los receptores recombinantes solubles para el factor de necrosis tumoral (TNF)- α se han usado en conjunto con metotrexato en el tratamiento de la artritis. Sin embargo, solamente aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α tales como receptores recombinantes solubles para TNF- α muestran una mejoría clínicamente significativa. Muchos pacientes siguen siendo refractarios a pesar del tratamiento. Aún quedan asuntos de tratamiento difíciles para los pacientes con artritis reumatoide. Muchos de los tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden impedir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, ningún tratamiento es ideal, y no existe cura. Nuevas terapias se necesitan que traten más eficazmente la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios.

2.2.3 enfermedades infecciosas

45 Los agentes infecciosos que causan la enfermedad en cinco grupos: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (gusanos). La notable variedad de estos patógenos ha causado la selección natural de dos rasgos cruciales de la inmunidad adaptativa. Primero, la ventaja de ser capaz de reconocer una amplia variedad de patógenos diferentes condujo al desarrollo de receptores en las células B y T de igual o mayor diversidad. Segundo, los distintos hábitats y ciclos de vida de los patógenos se deben contrarrestar con un intervalo de distintos mecanismos efectores. Los rasgos característicos de cada patógeno son su modo de transmisión, su mecanismo de replicación, su patogénesis o el medio por el cual causa enfermedad, y la respuesta que induce.

55 El registro de sufrimiento humano y muerte causados por viruela, tifus, disentería, malaria, etc. establece el predominio de las enfermedades infecciosas. A pesar de los éxitos sobresalientes en el control proporcionado por el saneamiento, inmunización, y terapia antimicrobiana mejorados, las enfermedades infecciosas continúan siendo un problema común y significativo de la medicina moderna. La enfermedad más común del género humano, el resfriado común, es una enfermedad infecciosa, como es la temida enfermedad moduladora del SIDA. Algunas enfermedades

neurológicas crónicas que se pensaron siendo enfermedades degenerativas se probaron que eran infecciosas. No hay duda que el futuro continuará revelando las enfermedades contagiosas como los principales problemas médicos.

5 Un enorme número de enfermedades de seres humanos y animales resultan de infecciones virulentas y oportunistas a partir de cualquiera de los agentes infecciosos mencionados anteriormente (véase Belshe (Edición) 1984 Textbook of Human Virology, PSG Publishing, Littleton, MD).

10 Una categoría de las enfermedades infecciosas son por ejemplo las infecciones virales. Las enfermedades virales de una amplia gama de tejidos, incluyendo el tracto respiratorio, SNC, piel, tracto genitourinario, ojos, oídos, sistema inmune, tracto gastrointestinal, y sistema musculoesquelético, afectan a un gran número de seres humanos de todas las edades (véase Tabla 328-2 En: Wyngaarden y Smith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18va. Edición, W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs 1750-1753). A pesar del esfuerzo considerable que ha invertido en el diseño de terapias antivirales eficaces, las infecciones virales continúan amenazando millones de personas en el mundo. Generalmente, los intentos de desarrollar fármacos antivirales han centrado en varias etapas del ciclo de vida viral (véase, por ejemplo, Mitsuya y otros, 1991, FASEB J. 5:2369-2381, discusión sobre el VIH). Sin embargo, un inconveniente común asociado con el uso de muchas drogas antivirales actuales es sus efectos secundarios perjudiciales, tal como la toxicidad en el huésped o resistencia por ciertas cepas virales.

3. Resumen de la invención

20 Se describe aquí la identificación de las regiones Fc de cadena pesada IgG1 humano mutante, con afinidades alteradas para receptores FcγR (por ejemplo, FcγRs activadores, FcγRs inhibidores), usando un sistema de exposición en levadura. La modelación animal y experimentos clínicos in vivo indican que la región Fc juega un papel esencial en la determinación del resultado de la terapia con anticuerpo monoclonal. Enfoques actuales para optimizar la función de la región Fc (por ejemplo, actividad de citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) en anticuerpos monoclonales terapéuticos y polipéptidos solubles fusionados a regiones Fc se han enfocado en un número limitado de cambios de aminoácidos basados en el análisis estructural y/o diseños asistidos por computadora. Enfoques alternativos en las regiones Fc diseñadas por ingeniería se han enfocado en la glicosilación de la región Fc para optimizar la función de la región Fc. Se describe aquí una selección de los posibles mutantes para la alteración de una o más actividades funcionales de Fc, tales como pero sin limitarse a ADCC y CDC, a partir de una genoteca imparcial de Fc variantes. La presente descripción detalla métodos de diseño por ingeniería de regiones Fc e identificación y tamizaje de nuevas variantes Fc además de las regiones esperadas identificadas por estudios estructurales. Las regiones esperadas como se utilizan en la presente se refieren a las regiones que basadas en estudios estructurales y/o bioquímicos están en contacto con un ligando Fc.

35 Se describe aquí una plataforma de descubrimiento para la identificación de variantes Fc con mejoría en una o más funciones efectoras de Fc mediante ensayos funcionales basados en la combinación celular y la construcción de la genoteca combinatoria con declaración de la técnica de avanzada. La presente divulgación recopila las genotecas combinatorias completas por regiones de saturación de interés dentro de Fc con modificaciones que cubren todos los cambios de aminoácidos posibles. Las genotecas combinatorias se probarán usando un conjunto de ensayos funcionales y de unión para seleccionar mutantes basados en la función biológica mejorada.

40 La presente invención se relaciona con moléculas, preferentemente polipéptidos, y con mayor preferencia inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprende una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero que incluyen además inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones alteran, por ejemplo, aumentan o disminuyen, la afinidad de la región Fc variante por una FcγR. Específicamente, dicha una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y preferiblemente dichas una o más modificaciones aumentan la afinidad de FcγRIIA.

50 La presente invención se basa en un polipéptido que comprende una región Fc de IgG1 variante, en la que dicha región de Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con relación a una región silvestre Fc de IgG1, de tal manera que dicha región de Fc variante de dicho polipéptido se une a FcRIIIa con una mayor afinidad, y FcγRIIB con afinidad de unión alterada; en donde dichas mayores y alteradas afinidades de unión están en relación con las afinidades de unión exhibidas por tal polipéptido a dicha FcγRs si que comprende una región Fc de tipo silvestre; y en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende un conjunto de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de: (1) una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 292 por prolina; (2) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 por isoleucina;

(3) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; (4) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; y (5) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; en donde las posiciones se numeran de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.

En una realización preferida, las moléculas de la invención se unen además específicamente a FcγRIIB (a través de la región Fc) con una afinidad inferior que la molécula comparable (es decir, que tiene la misma secuencia de aminoácido que la molécula de la invención excepto por la una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc) que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIB. En algunas realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA y opcionalmente FcγRIIB y mejoran la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre. Una realización preferida es una región Fc variante que tiene una afinidad mejorada por FcγRIIA y FcγRIIB pero afinidad reducida por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre.

Las variantes Fc de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc, que incluyen pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar un Fc variante de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas, o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferentemente, las Fc variantes de la invención mejoran el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una Fc variante de la invención se combina con un mutante conocido para unirse a FcγRIIA con una afinidad superior que una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre; la combinación con un mutante de la invención resulta en una mejoría mucho mayor en la afinidad de FcγRIIA.

En una realización, las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con otras Fc variantes conocidas tal como las descritas en Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564; Lund y otros, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre y otros, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins y otros, 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis y otros, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund y otros, 1995, FASEB J 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y otros, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie y otros, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie y otros, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572. En ciertas realizaciones, las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con una o más de las Fc variantes, es decir, modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, presentadas en las Tablas 5, 6, 7, y 8, infra.

La invención abarca moléculas que son homodímeros o heterodímeros de las regiones Fc. Heterodímeros que comprenden las regiones Fc se refieren a las moléculas donde las dos cadenas Fc tienen secuencias iguales o diferentes. En algunas realizaciones, en las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, cada cadena tiene una o más modificaciones diferentes a la otra cadena. En otras realizaciones, en las moléculas heterodiméricas que comprenden unas regiones Fc variantes, una cadena contiene la región Fc tipo silvestre y las otras cadenas comprenden una o más modificaciones. Los métodos para diseñar por ingeniería moléculas que contienen el Fc heterodimérico se conocen en la técnica y se incluyen dentro de la invención.

Se describen en la presente moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, cuya región Fc variante no se une a ningún FcγR o se une con una afinidad reducida, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, determinado por ensayos estándar (por ejemplo, ensayos in vitro) conocidos para una persona con experiencia en la técnica. En una realización específica, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, cuya región Fc variante solamente se une con una FcγR, en donde dicha FcγR es FcγRIIA.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención por una FcγR se determinan inicialmente usando ensayos in vitro (ensayos bioquímicos e inmunológicos) conocidos en la técnica para la determinación de las interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase sección 5.2.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan además mediante ensayos funcionales in vitro para la determinación de una o más funciones celulares del efector mediador FcγR (véase sección 5.2.6). En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas de la invención tienen

propiedades de unión similares en los modelos in vivo (tales como las descritas y divulgadas en la presente) como en los ensayos basados in vitro Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos basados in vitro pero que exhiben el fenotipo deseado in vivo.

5 En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 329, 331, o 332, y no incluyan o no sean solamente una sustitución con cualquiera de: alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333,
10 334, 359, 360, 326, o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335.

15 En otra realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIA, siempre que la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyan o no sean solamente una sustitución con una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272, o 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

25 En una realización específica preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por una FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que realizan un contacto directo con la FcγR basado en análisis cristalográficos y estructurales de las interacciones Fc-FcγR tales como aquellas descritas por Sondermann y otros, (2000 Nature, 406: 267-273, que es incorporada aquí por referencia en su totalidad). Ejemplos de posiciones dentro
30 de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (bucle C/E), y los aminoácidos 327-332 del bucle (G/F). En algunas realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden las regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que no hace contacto directo con un FcγR basado en el análisis estructural y
35 cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión de Fc-FcγR.

En otra realización preferida, la presente invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre, siempre que dicha al menos una modificación de aminoácidos
40 no incluya o no es solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359; 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre, siempre que dicha región Fc variante no incluya o no es solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289,
45 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 y no tiene una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326, o
50 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

5 En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante no incluye o no es solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439 y no tiene una histidina, glutamina, o tirosina en la posición 280; una serina, glicina, treonina o tirosina en la posición 290, una leucina o isoleucina en la posición 300; una asparagina en la posición 294, una prolina en la posición 296; una prolina, asparagina, ácido aspártico o valina en la posición 298; una lisina en la posición 295. En aún otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad reducida en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, o 439. En aún otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad mejorada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, o 430.

20 En una realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante no incluye una sustitución o no tiene solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269, o 328 y no tiene una leucina en la posición 243, una asparagina en la posición 298, una leucina en la posición 241, e isoleucina o una alanina en la posición 240, una histidina en la posición 244, una valina en la posición 330, o una isoleucina en la posición 328.

25 En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA por al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA por más de 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces, o al menos 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención, las moléculas de la invención que comprende una región Fc variante se unen específicamente a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 95 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 200 % mayor afinidad en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre. Tales mediciones son preferentemente ensayos in vitro.

40 La invención abarca moléculas con afinidades alteradas para activar y/o inhibir los receptores Fcγ. En particular, la invención contempla moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB y además disminuyen la afinidad de la regiones Fc variantes por una FcγRIIA en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre. En aún otras realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB y además aumentan la afinidad de las regiones Fc variantes por una FcγRIIIA y preferiblemente para FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre. En aún otras realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y preferiblemente para FcγRIIB pero reducen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc tipo silvestre.

50 En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas una o más modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIIA y FcγRIIB con afinidad tipo silvestre. En una cierta realización, la una o más modificaciones de aminoácidos no es una sustitución con alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333, o 334.

55 En otra realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas una o más modificaciones aumentan la

afinidad de la región Fc variante por una FcyRIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcyRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcyRIIA y FcyRIIB con afinidad tipo silvestre. En una cierta realización, la una o más modificaciones de aminoácidos no es una sustitución con arginina en la posición 320.

5 En realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención con afinidades alteradas por receptores activadores y/o inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en donde dicha una o más modificación de aminoácidos es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10) (véase las Tablas 5 & 6); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución
10 en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina, y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina, y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una
15 sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición
20 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la
25 posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina. En una realización relacionada, la región Fc variante comprende además una o más modificaciones de aminoácidos descritas en las Tablas 5, 6, 7, y 8. infra.

30 El método preferido para el tamizaje e identificación de las moléculas que comprenden las regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcyR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcyRIIIA) es la tecnología de presentación en la superficie de levadura (para revisión véase Boder y Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444). Específicamente, la presentación en la superficie de levadura es un método genético por medio del cual los polipéptidos que comprenden mutantes Fc se expresan en la pared celular de la levadura de forma accesible para la interacción con FcyR. La presentación en la superficie de levadura del mutante Fc que contiene los polipéptidos de
35 la invención se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica o los métodos específicos descritos en la presente. La exposición en levadura ofrece la ventaja de utilizar la unión actual a un receptor deseado para identificar las regiones Fc variantes que tienen la unión mejorada a ese receptor.

40 Un aspecto de la invención proporciona un método para la selección de proteínas de fusión del mutante Fc con una propiedad de unión deseable, por ejemplo, la capacidad de la proteína de fusión del mutante Fc de unirse a FcyRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcyRIIIA. Las células de levaduras que presentan las proteínas de fusión del mutante Fc se pueden tamizar y caracterizar por cualquiera de los ensayos bioquímicos e inmunológicos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para la evaluación de las interacciones de unión. En una realización específica, el tamizaje de proteínas
45 de fusión del mutante Fc se realiza usando uno o más ensayos bioquímicos, por ejemplo, un ensayo ELISA.

En realizaciones preferidas, el tamizaje e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcyR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcyRIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o más ensayos bioquímicos, preferentemente de modo rápido. Uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-FcyR, es decir, la unión específica de una región Fc a FcyR, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y diálisis de equilibrio. En algunas realizaciones, el tamizaje e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcyR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcyRIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o más ensayos funcionales, preferentemente de modo rápido. Los ensayos
50 funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para la caracterización de una o más funciones de células efectoras mediadas por FcyR tales como las descritas en la presente en la Sección 5.2.6. Los ejemplos no limitativos de funciones de células efectoras que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención,

incluyen pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpo, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, rosetas, unión a Clq, y citotoxicidad mediada por la célula dependiente de complemento. En algunas realizaciones, el tamizaje e identificación moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a Fc γ R (por ejemplo, afinidad mejorada a Fc γ RIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o más ensayos bioquímicos en conjunto o en paralelo con uno o más ensayos funcionales, preferentemente de modo rápido.

Un método preferido para la medición de la interacción Fc γ R-Fc de acuerdo con la invención es un ensayo desarrollado por los inventores, que permite la detección y cuantificación de la interacción, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA. El método implica la formación de un complejo Fc γ R (por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB) que tiene una avidéz mejorada para una región Fc, en relación con un Fc γ R no complejado. En una realización específica, la invención abarca un método para la producción de un complejo Fc γ R tetramérico, en donde dicho complejo tetramérico tiene una afinidad mejorada para una región Fc, en relación con la afinidad de un Fc γ R monomérico para la región Fc, dicho método que comprende: (i) producir una proteína de fusión, tal que una secuencia de 15 aminoácidos AVITAG se une operablemente a la región soluble de Fc γ R; (ii) biotilinar la proteína producida usando una enzima BirA de *E. coli*; (iii) mezclar la proteína biotilada producida con estreptavidina-ficoeritrina en una relación molar apropiada, tal que se forma un complejo Fc γ R tetramérico.

En una realización preferida de la invención, polipéptidos que comprenden regiones Fc unen los complejos Fc γ R tetraméricos, se forman de acuerdo con los métodos de la invención, con al menos una afinidad 8 veces mayor que con la que unen el Fc γ R no complejado monomérico. La unión de polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos Fc γ R tetraméricos se puede determinar usando técnicas estándar conocidas para aquellos con experiencia en la técnica, tales como por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos de ELISA, etc.

La invención abarca el uso de los complejos inmunes formados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o libres de células.

En una realización específica, la invención proporciona inmunoglobulinas modificadas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA y preferiblemente también para Fc γ RIIA. Tales inmunoglobulinas incluyen moléculas IgG que contienen naturalmente regiones de unión a Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a FcRIIIA y/o FcRIIB), o derivados de inmunoglobulina que se han manipulado genéticamente para que contenga una región de unión a Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a FcRIIIA y/o FcRIIB). Las inmunoglobulinas modificadas de la invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferentemente, inmunoespecíficamente, es decir, compite por la unión no específica que se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar la unión específica antígeno-anticuerpo, un antígeno y contiene una región de unión a Fc γ R (por ejemplo, una región de unión a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIB). Tales anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, monoclonales, bi-específicos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs enlazado a disulfuro, y fragmentos que contienen ya sea un dominio VL o VH o incluso una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, manipulado genéticamente para contener o fusionarse a una región de unión Fc γ R.

En cierta realización, la invención abarca inmunoglobulinas que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA y preferiblemente también para Fc γ RIIA tal que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. La función efectora de las moléculas de la invención puede ensayarse usando cualquier ensayo descrito en la presente o conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen una actividad ADCC mejorada en relación con una región tipo silvestre por al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces.

La invención abarca anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados manipulados genéticamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos del tumor) en la región Fc por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de uno o más residuos de aminoácidos, cuyas modificaciones modulan la afinidad del anticuerpo terapéutico por un receptor activador Fc γ R y/o un receptor inhibidor Fc γ R. En una realización, la invención se relaciona con anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados manipulados genéticamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos del tumor) en la región Fc por modificación de uno o más residuos de aminoácidos, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc por Fc γ RIIIA y preferiblemente también para Fc γ RIIA. En otra realización, la invención se relaciona con anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados

manipulados genéticamente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos del tumor) en la región Fc por modificación de uno o más residuos de aminoácidos, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y preferiblemente también para FcγRIIA y disminuye además la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Los anticuerpos terapéuticos manipulados genéticamente pueden tener además una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., como se determina por ensayos estándar conocidos para aquellos con experiencia en la técnica.

En una realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, anticuerpo humanizado Ab4D5 como descrito en Carter y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9) por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado puede disminuir además la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, los anticuerpos monoclonales humanizados manipulados genéticamente específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora mejorada como determinado por los ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción.

En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-CD20 por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y preferiblemente también para FcγRIIA. En una realización relacionada, el anticuerpo anti-CD20 es el anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano y ratón, 2H7. Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-CD20 adicionales que se pueden usar en los métodos de la invención se describen en la Solicitud de patente de Estados Unidos No. 11/271,140, presentada el 10 de Noviembre de 2005 (publicada como US 2006 0134709. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 puede además disminuir más aun la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Aun en otra realización específica, el anticuerpo anti-CD20 anticuerpo monoclonal, 2H7 manipulado genéticamente puede tener además una función efectora mejorada como determinado por los ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción.

En otra realización específica, la invención abarca el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente, particularmente un anticuerpo anti-FcγRIIB que se une específicamente un FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-FcγRIIB representativos se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/403,266 presentada el 12 de Agosto de 2002; solicitud U.S. No. 10/643,857 presentada el 14 de Agosto de 2003 (publicada como US 2004 0185045); y la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos Nos: 2004-0185045; 2005-0260213; y 2006-0013810.

Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB que pueden ser manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención son los anticuerpos monoclonales producidos por el clon 2B6, 3H7, 8B5.4.3, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen números de acceso a ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente (depositados en la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011, los que se incorporaron en la presente como referencia), o quiméricos, humanizados u otras versiones manipuladas genéticamente de estos.

En una realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. En otra realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. En una realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.:2 o sec. con núm. de ident.:3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:6, sec. con núm. de ident.:7 o sec. con núm. de ident.: 8. En una realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:9 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:10.

En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB puede disminuir además la afinidad de la región Fc por una FcγRIIB. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente puede tener además una función efectora mejorada determinada por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y

5 en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico, y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina. En una realización relacionada, la región Fc variante comprende además una o más modificaciones de aminoácidos descritas en las tablas 5, 6, 7, y 8, infra.

25 La presente invención incluye polinucleótidos que codifican una molécula de la invención, que incluyen polipéptidos y anticuerpos, identificados los métodos de la invención. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, por cualquier método conocido en la técnica. La invención se relaciona con un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de la invención. La invención proporciona además un vector que comprende dicho ácido nucleico. La invención proporciona adicionalmente células huésped que contienen los vectores o polinucleótidos de la invención.

30 La invención proporciona adicionalmente métodos para la producción de las moléculas de la invención. Las moléculas de la invención, incluyen polipéptidos y anticuerpos, que pueden producirse por cualquier método conocido para aquellos con experiencia en la técnica, particularmente, mediante expresión recombinante. En una realización específica, la invención se relaciona con un método para producir recombinantemente una molécula de la invención, dicho método que comprende: (i) cultivar en un medio una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicha molécula, bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicha molécula; y (ii) recuperar dicha molécula de dicho medio.

35 Las moléculas identificadas de acuerdo con los métodos de la invención son útiles para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno donde se desea una eficacia mejorada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, y para mejorar la eficacia terapéutica de los anticuerpos terapéuticos cuyo efecto se media por ADCC. De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona el uso de acuerdo con la reivindicación 14, 15, 16 o 17.

40 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar en un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une al antígeno de cáncer, que se ha manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización específica, el anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar en un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente dicho antígeno de cáncer, dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que el anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en la posiciones 329,331, o 332, y no tiene una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334. En otra realización específica, el anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar en un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une

específicamente a un antígeno de cáncer, dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre de manera que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que a anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIIA, y dicho anticuerpo terapéutico se une además específicamente a FcγRIIB con una afinidad inferior que un anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIB, siempre que dicha región Fc variante no tiene una alanina en ninguna de las posiciones 256, 298, 333, o 334. La invención abarca un método para tratar cáncer en un paciente caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente dicho antígeno de cáncer y dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante de manera que el anticuerpo tiene una actividad ADCC mejorada.

Las moléculas de la invención se pueden usar en un método para tratar un trastorno autoinmune y/o trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, dicho método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, y dicha molécula además se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad inferior que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, y dicha molécula se une a un complejo inmune (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo). La molécula de la invención se puede usar en un método para tratar un trastorno autoinmune y/o trastorno inflamatorio que comprende además administrar uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, usados para el tratamiento y/o prevención de dichas enfermedades.

Las moléculas de la invención además se pueden usar métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que unen por consiguiente un agente infeccioso o receptor celular. Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar o prevenir con las moléculas de la invención son causadas por agentes infecciosos que incluyen pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes tienen una función efectora de anticuerpo mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En una realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa mediante la fagocitosis y/o opsonización mejorada del agente infeccioso que causa la enfermedad infecciosa. En otra realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa mediante ADCC mejorada de las células que causan la enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se pueden administrar en conjunto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad infecciosa. La invención contempla el uso de las moléculas de la invención en conjunto con antibióticos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica en la técnica para el tratamiento y o la prevención de una enfermedad infecciosa.

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de la invención, por ejemplo, un polipéptido que comprende una región Fc variante, una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante, un anticuerpo terapéutico manipulado genéticamente de acuerdo con la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen pero no se limitan a agentes contra el cáncer, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores.

3.1 Definiciones

Como se utiliza en la presente, el término "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque pueden variar ligeramente los límites, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define que se extiende desde Cys226 hasta el carboxi terminal. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (denominado también como dominio "Cγ2") generalmente se extiende desde el aminoácido 231 al aminoácido 338. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana generalmente se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447. El dominio CH2 es el único que no está estrechamente apareado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas enlazadas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

A lo largo de la presente especificación, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es el del índice de la UE como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), se incorpora expresamente como referencia en la presente. "índice de la UE como en Kabat" se refiere a la numeración de la UE del anticuerpo IgG1 humano.

- 5 La "región bisagra" generalmente se define como el estiramiento desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 mediante la colocación de los residuos de la primera y última cisteína que forman enlaces S-S intercadena pesada en las mismas posiciones.

10 Como se usa en la presente, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs unidos por puentes disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para los anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Particularmente, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

20 Como se usa en la presente, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácido que se ha alterado por la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado" como se usa en la presente se refiere además a un polipéptido o proteína que se ha modificado, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Un polipéptido o proteína derivado se puede producir por modificaciones químicas usando técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado o derivado de proteína posee una función similar o idéntica a la del polipéptido o proteína a partir de la que se derivó.

30 Como se utilizan en la presente, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basada en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero sin limitarse a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amino. Una molécula orgánica se puede además esterificar, alquilar y/o fosforilar.

35 Como se usan en la presente, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a una afección en un sujeto. Particularmente, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/o de órgano provocada por una reacción inmunológica del sujeto frente a sus propias células, tejidos y/o órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por la inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con la inflamación. Además, la inflamación puede o no ser provocada por un trastorno autoinmunitario. Así, ciertos trastornos se pueden caracterizar como ambos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios.

40 Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o un tumor resultante de un crecimiento no controlado anormal de células. Como se usa en la presente, el cáncer incluye explícitamente, leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras vecinas del cuerpo y propagado a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno específico de cáncer.

45 Como se usa en la presente, el término "agente inmunomodulador" y variaciones de este se refieren a un agente que modula el sistema inmunológico de un huésped. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En otras ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitarse a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos, y moléculas orgánicas.

50 Como se usa en la presente, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula que no es de proteína que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y con la máxima preferencia en un humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un

fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al cual un anticuerpo se une inmunoespecíficamente como se determinó por cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesitan necesariamente ser inmunogénicos.

5 Como se usa en la presente, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una
 secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos
 10 contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al
 menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50
 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de
 15 aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos
 contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al
 menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200
 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de
 aminoácido de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido mantiene al menos
 una función del polipéptido.

Como se usa en la presente, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencia de nucleótidos" incluyen moléculas de
 ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de
 ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbrido, y análogos de moléculas ADN o ARN. Tales análogos se pueden
 20 generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitarse a, inosina o bases tritiladas.
 Tales análogos pueden comprender además moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales
 modificadas que proporcionan atributos beneficiosos para las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a
 nucleasa o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. La secuencia de nucleótidos o ácidos
 nucleicos pueden ser de cadena sencilla, de cadena doble, puede contener tanto cadena sencilla como porciones de
 cadena doble, y puede contener porciones de cadena triple, pero preferentemente es ADN de cadena doble.

25 Como se utilizan en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente
 terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz
 puede referirse a la cantidad del agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de la
 enfermedad, por ejemplo, retardar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz
 puede referirse además a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el
 30 tratamiento o el manejo de una enfermedad. Adicionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a
 un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en conjunto con otras
 terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo de una enfermedad.

Como se usan en la presente, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier
 agente(s) que se puede(n) usar en la prevención de un trastorno, o prevención de recurrencia o la propagación de
 35 un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede referir a la cantidad de agente profiláctico suficiente
 para evitar la recurrencia o propagación de la enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición
 de ella en un paciente, que incluyen, pero sin limitarse a, los predispuestos a enfermedad hiperproliferativa, por
 ejemplo, los genéticamente predispuestos al cáncer o expuestos anteriormente a carcinógenos. Una cantidad
 40 profilácticamente eficaz se puede referir además a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio
 profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un
 agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en conjunto con otros agentes,
 que proporciona un beneficio para evitar la enfermedad.

Como se usa en la presente, los términos "evitar", "evitando" y "prevención" se refieren a la prevención de la
 45 recurrencia o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un
 agente terapéutico o profiláctico.

Como se usa en la presente, el término "en conjunto" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o
 terapéutico. El uso del término "en conjunto" no restringe el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos
 se administran a un sujeto con un trastorno. Un primer agente terapéutico o profiláctico puede administrarse antes de
 50 (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas,
 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o
 12 semanas antes), conjuntamente con o posteriormente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45
 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas,
 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, or 12 semanas después) la administración de un
 segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

5 "Función efectora" como se usa en la presente se entiende un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen pero sin limitarse a citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCP), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto las que operan después de la unión de un antígeno y las que operan independiente de la unión al antígeno.

10 Por "célula efectora" como se usa en la presente se entiende una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero sin limitarse a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos grandes granulares, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK), y pueden ser de cualquier organismo que incluye pero sin limitarse a, humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

15 Por "ligando de Fc" como se usa en la presente se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo ligando-Fc. Los ligando de Fc incluyen pero sin limitarse a FcγRs, FcγRs, FcγRs, FcRn, C1q, C3, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, y FcγR viral. Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que unen a Fc.

15 4. Breve descripción de las figuras

Figura 1 Esquema de la secuencia del dominio variable de la cadena ligera 8B5.3.4

Representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de 8B5.3.4 VL (sec. con núms. de ident.:11 y 10, respectivamente).

Figura 2 Esquema de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada 8B5.3.4

20 Representación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de 8B5.3.4 VH (sec. con núms. de ident.:12 y 9, respectivamente).

Figura 3 Análisis en sds-page de FcγR recombinante soluble

25 La pureza de las proteínas de FcγR recombinante soluble se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 10 %. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Carril 1: FcγRIIIA recombinante soluble purificado; carril 2: marcador de peso molecular; carril 3: marcador de peso molecular; carril 4: FcγRIIB recombinante soluble purificado. Los guiones se refieren al peso molecular de los marcadores, de la parte superior a la inferior, se corresponden con un peso molecular de 98, 50, 36, y 22 KDa respectivamente.

Figura 4 Ensayo elisa del FcγR recombinante soluble

30 La unión directa del FcγRIIIA recombinante soluble purificado con la IgG agregada y monomérica se determinó usando un ensayo ELISA. Unión de (▲) IgG agregada con 3G8; (◆) IgG biotinilada; (■) IgG agregada; (X) IgG agregada con IgG1 de ratón.

Figuras 5 A y B Caracterización del complejo tetramérico FcγRIIIA usando un ensayo ELISA

35 **A.** complejo FcγRIIIA tetramérico soluble se une específicamente a IgG humana monomérica soluble. La unión de FcγRIIIA tetramérico soluble con IgG humana se bloquea con 3G8 (◆), un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA de ratón; el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que alberga la mutación D265A no fue capaz de bloquear la unión del FcγRIIIA tetramérico soluble con la IgG humana agregada (Δ).

B. Unión del complejo FcγRIIIA tetramérico soluble con IgG humana monomérica soluble (■) se compara con la unión del FcγRIIIA monomérico soluble con la IgG humana monomérica (◆).

Figuras 6 A y B Caracterización del complejo FcγRIIIA tetramérico usando un ensayo de perla magnética

40 **A.** Complejo FcγRIIIA: dos FcγRIIIA (forma llena) se unen con un anticuerpo monoclonal DJ130c (1st Ab); el anti-F(ab)2 de ratón se conjuga con PE (círculo).

B. Análisis FACS del FcγRIIIA unido con glóbulos recubiertos con Fc: (a) glóbulos solos; (b) complejo sin FcγRIIIA; (c) complejo con FcγRIIIA; (d) complejo con FcγRIIIA y LNK16.

Figura 7 Presentación esquemática de constructos que contienen Fc

5 Se presenta un diagrama esquemático de los dominios Fc de IgG1 clonados dentro de pYD1. La caja abierta representa los dominios bisagra-CH2-CH3; líneas verticales paralelas representan el dominio CH1. En el caso de los constructos GIF206 y 227; se muestran los aminoácidos N-terminales. Los residuos subrayados corresponden con la región bisagra; el * representa la etiqueta del epítipo Xpress; cajas sombreadas representan el enlazador Gly4-Ser, y las cajas punteadas representan el gen Aga2p.

Figuras 8A-H Análisis facs de las proteínas de fusión de Fc en la pared celular de levadura

10 Las células se incubaron ya sea con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano en cabra conjugado con PE (FIGS. 8A-D) o con HP6017 (Sigma), un anticuerpo monoclonal específico anti-Fc (CH3) de IgG1 humana en ratón (FIGS. 8E-H). A y E representan el vector sólo; paneles B y F representan el constructo CH1-CH3; paneles C y G representan el GIF227; y los paneles D y H representan el constructo GIF 206.

Figuras 9A-C Unión del FcγRIIIA tetramérico soluble con las proteínas de fusión de Fc expuestas en la superficie

15 Las células que contienen el vector pYD1-CH1 (A); pYD-CH1-D265A (B); y pYD (C) se cultivaron en condiciones para expresar proteínas de fusión Aga2p en la superficie celular. Las células se incubaron con FcγRIIIA a 0.15 mM, 7.5 mM, y 7.5 mM, respectivamente, y analizaron mediante FACS.

Figura 10 Caracterización de la unión del FcγRIIIA tetramérico soluble a las proteínas de fusión de Fc expuestas en la superficie

20 La unión del complejo FcRIIIa tetramérico con las proteínas de fusión de Fc en la superficie celular de levadura se analizó. Los complejos FcγRIIIA tetraméricos conjugados con PE se pre-incubaron con diferentes concentraciones de 3G8 (◆), LNK (▲) o un control de isotipo irrelevante (■), e incubaron posteriormente con las células de levadura. Las células se analizaron mediante FACS para la fluorescencia de PE. El porcentaje de células que unen el complejo FcγRIIIA tetramérico se representaron en el eje y.

Figura 11 Ejemplo de la puerta de clasificación para la selección de mutantes Fc con unión aumentada a FcγRIIIA

25 Las células se tiñeron con los complejos FcRIIIa tetraméricos conjugados con PE (eje y) y el anticuerpo anti-Fc-FITC conjugado (eje x). El área en caja representa la puerta de clasificación ajustada para seleccionar ~ el 1.0 % de la población celular.

Figuras 12A-N Análisis facs de algunos de los mutantes Fc identificados con una afinidad aumentada por los complejos FcγRIIIA tetraméricos

30 Los clones individuales que albergan el plásmido pYD-CH1 que contiene mutaciones Fc independientes se amplificaron en medios selectivos que contienen glucosa, indujeron para la expresión de Fc, en medios selectivos que contienen galactosa, y analizaron posteriormente por FACs. Las Figs. 12A y B representan las células que albergan Fc tipo silvestre; Figs. 12C y D representan el mutante # 5; Figs. 12E y F representa el mutante # 20; Figs. 12G y H representan el mutante # 21; Figs. 12I y J representan el mutante # 24; Figs. 12K y L representan el mutante # 25; Figs. 12M y N representan el mutante # 27. Las células se tiñeron con el complejo FcγRIIIA tetramérico (Figs. 12A, C, E, G, I, K, y M) o complejo FcγRIIIB tetramérico (Figs. 12B, D, F, H, J, L, y N).

Figuras 13 A-B Caracterización de los mutantes Fc en el anticuerpo monoclonal 4-4-20 mediante elisa

40 Dominios Fc de los plásmidos pYD-CH1 se clonaron dentro de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal quimérico 4-4-20. El anticuerpo monoclonal 4-4-20 se expresó en las células 293 y se recogieron los sobrenadantes. Las placas de ELISA se recubrieron con BSA conjugada con fluoresceína para capturar los anticuerpos mutantes quiméricos 4-4-20. Los receptores FcγRIIIA (A) y FcγRIIB (B) se recubrieron después sobre las placas de ELISA para lo que se absorbieron los anticuerpos monoclonales 4-4-20 para determinar las afinidades relativas de los receptores variantes a los dominios Fc. Mutantes # 15 y # 29 aislados que no se unieron se incluyeron como controles.

Figura 14 Actividad ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal 4-4-20

Anticuerpos 4-4-20 que contienen mutantes de regiones Fc se evaluaron para su actividad ADCC, y compararon con la actividad ADCC de un anticuerpo 4-4-20 tipo silvestre. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-26 (D265A), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E), MGFc-28 (N315I, A379M, D399E), MGFc-29 (F243I, V379L, G420V), MGFc-30 (F275V), MGFc-31 (P247L, N421K), MGFc-32 (D280E, S354F, A431D, L441I), MGFc-33 (K317N, F423 eliminado), MGFc-34 (F241L, E258G), MGFc-35 (R255Q, K326E), MGFc-36 (K218R, G281D, G385R)

5

Figuras 15 A y B Actividad ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal her2/neu humanizado

A. Anticuerpos monoclonales HER2/neu humanizados que contienen regiones Fc mutantes se evaluaron para su actividad ADCC y compararon con la actividad ADCC de un anticuerpo Her2/neu tipo silvestre. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc-5 (V379M), MGFc-9 (F243I, V379L), MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-13 (K334E, T359N, T366S), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E).

10

B. Actividad ADCC de mutantes adicionales en el contexto del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado MGFc-37 (K248M), MGFc-39 (E293V Q295E, A327T), MGFc-38 (K392T, P396L), MGFc-41 (H268N, P396L), MGFc-23 (K334E, R292L), MGFc-44, MGFc-45. Se probaron dos clones independientes para cada mutante.

15

Figura 16 Captura del anticuerpo ch 4-4-20 en la superficie de BSA-FITC

6 μ L de anticuerpo en una concentración de aproximadamente de 20 μ g/ml se inyectó a 5 μ L/min en una superficie de BSA- isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se muestra el sensograma BIAcore de la unión de los anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes en la superficie del chip del sensor inmovilizado con BSA-FITC. El marcador se ajustó con la respuesta del anticuerpo tipo silvestre capturado.

20

Figura 17 Sensograma de la unión en tiempo real de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch 4-4-20 que portan regiones Fc variantes

La unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes se analizó a la concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron en el nivel del anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo silvestre.

25

Los mutantes usados fueron los siguientes: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14 (K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

Figuras 18 A-H Análisis de los parámetros cinéticos de la unión de Fc γ RIIIA con anticuerpos que portan regiones Fc variantes

Los parámetros cinéticos de la unión de Fc γ RIIIA a los anticuerpos que portan regiones Fc variantes se obtuvieron mediante la generación de mejores curvas de ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea sólida indica un ajuste de asociación que se obtuvo basado en los valores de k_{off} calculados de las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. Los valores de K_d y k_{off} representan el promedio de dos concentraciones.

30

Figura 19 Sensograma de la unión en tiempo real de proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc a los anticuerpos que portan regiones Fc variantes

La unión de proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc con anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes se analizó a la concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron en el nivel del anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo silvestre.

35

Figuras 20 A-C Análisis de los parámetros cinéticos de las proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc con los anticuerpos que portan regiones Fc variantes

Los parámetros cinéticos de la unión de Fc γ RIIB-Fc a los anticuerpos que portan regiones Fc variantes se obtuvieron mediante la generación de mejores curvas de ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea sólida indica un ajuste de asociación que se obtuvo basado en los valores de k_{off} calculados de las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. Los valores de K_d y k_{off} representan el promedio de dos concentraciones.

40

Los mutantes usados fueron los siguientes: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14 (K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

Figuras 21 Relaciones de K_{off} (WT)/ K_{off} (MUT) representada para la Fc γ RIIIA-Fc contra datos ADCC

Números superiores que uno muestran una tasa de disociación disminuida para la unión a Fc γ RIIIA y tasa de disociación aumentada para la unión a Fc γ RIIB-Fc en relación con el tipo silvestre. Los mutantes en la caja tienen tasa inferior para la unión a Fc γ RIIIA y tasa superior para la unión a Fc γ RIIB-Fc.

5 Figura 22 Competencia con Fc γ RIIIA no marcado

Una tamizaje cinético se implementó para identificar mutantes de la región Fc con tasas Koff mejorada para la unión a Fc γ RIIIA. Una genoteca de región Fc variantes que contiene la mutación P396L se incubó con 0.1 μ M de Fc γ RIIIA -enlazador-Avitag biotinilado durante una hora y después se lavó. Posteriormente 0.8 μ M de Fc γ RIIIA no marcado se incubó con la levadura marcada para los diferentes intervalos de tiempos. La levadura se sedimentó por centrifugó y el Fc γ RIIIA no marcado se eliminó, el receptor unido a levadura se tiñó con SA (estreptavidina):PE ficoeritrina para el análisis FACS.

Figuras 23 A-C Análisis facs basado en el tamizaje cinético

Basado en la K_{off} calculada a partir de los datos presentados en la Fig. 22, se eligió una selección del intervalo de tiempo un minuto. Un exceso de 10 veces de la genoteca se incubó con 0.1 μ M del monómero Fc γ RIIIA-enlazador-Avitag biotinilado; las células se lavaron e incubaron con el ligando no marcado durante un minuto; después se lavaron y marcaron con SA:PE. Las células se clasificaron después por FACS, seleccionando los máximos 0.3 % de aglutinantes. La biblioteca P396L no seleccionada se comparó por FACS con las células de levadura seleccionadas para la unión mejorada. Los histogramas demuestran el porcentaje de células que se cotiñen tanto con Fc γ RIIIA /PE como anti-Fc humano en cabra/FITC.

20 Figuras 24 A-B Selección basada en la reducción de Fc γ RIIB Fc aglutinantes en la fase sólida

A. La biblioteca P396L se tamizó basado en la reducción de Fc γ RIIB y selección de Fc γ RIIIA usando perlas magnéticas. La reducción de Fc γ RIIB por las perlas magnéticas se repitió 5 veces. La población resultante de levadura se analizó y encontró mostrar más de 50 % de tinción celular con anti-Fc humano en cabra y un porcentaje muy pequeño de células teñidas con Fc γ RIIIA. Posteriormente las células se seleccionaron dos veces por FACS usando 0.1 μ M Fc γ RIIIA enlazador-avitag biotinilado. Las células de levadura se analizaron tanto para la unión a Fc γ RIIIA como Fc γ RIIB después de cada clasificación y compararon con la unión al tipo silvestre.

B. Los mutantes Fc se seleccionaron de la población de levadura con Fc γ RIIB reducido usando monómero Fc γ RIIIA 158F enlazador avitag biotinilado como un ligando. La puerta de clasificación se estableció para seleccionar los máximos 0.25 % de Fc γ RIIIA 158F aglutinantes. La población enriquecida resultante se analizó por FACS para la unión a los diferentes Fc γ RIIIA (158F y 158V), Fc γ RIIIB y Fc γ RIIA (131R).

Figura 25 tasas relativas de lisis de células objetivo skbr3 mediadas por 4D5 quimérico que alberga mutantes Fc

Las tasas relativas de lisis se calcularon para cada mutante Fc probado. Las tasas de lisis para el anticuerpo 4D5 con Fc mutantes se dividieron por la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 4D5 tipo silvestre. Los datos de al menos 2 ensayos independientes se promediaron y representaron en el histograma. Se muestran para cada dato de mutante Fc a partir de dos concentraciones diferentes de anticuerpos. Las concentraciones de anticuerpos se eligieron para flanquear el punto de la curva en que la lisis fue ~50 %.

Figura 26 Tasas relativas de la lisis de célula daudi mediadas por 2H7 quimérico que alberga mutantes Fc

Las tasas relativas de lisis se calcularon para cada mutante Fc probado. Las tasas de lisis para el anticuerpo 2H7 con los mutantes Fc se dividieron por la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 2H7 tipo silvestre. Los datos a partir de al menos 1- 2 ensayos independientes se promediaron y representaron en el histograma. Para cada mutante Fc, se muestran los datos de dos concentraciones diferentes de anticuerpos. Las concentraciones de anticuerpos se eligieron basado en el punto de la curva en que la lisis fue ~50 %.

Figura 27 Esquema para la producción de la genoteca.

Las cadenas de ADN se representan. Las flechas hacia delante representan los iniciadores que contienen codones mutantes. La flecha inversa representa el gen inverso oligo específico.

Figura 28 Estrategia para la producción de las genotecas por construcción de un protocolo de genes.

Las cajas rectangulares representan la bisagra, dominios CH2 y CH3, respectivamente. Las líneas negras cortas representan los oligos de cadena doble con salientes 5'.

Figura 29 Nuevos mutantes Fc mejoran la PBMC mediada por ADCC en células SKBR3.

5 El gráfico muestra el análisis de regresión lineal de un ensayo estándar de ADCC. El anticuerpo se tituló más de 3 logs usando una relación efector a objetivo de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR) / (MR-SR) * 100.

Figura 30 Nuevos mutantes Fc mejoran PBMC mediada por ADCC en células Daudi

El gráfico muestra el análisis de regresión lineal de un ensayo estándar de ADCC. El anticuerpo se tituló más de 3 logs usando una relación efector a objetivo de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR) / (MR-SR) * 100.

Figura 31 Perfiles del receptor Fc a través de facs tras el tratamiento de los monocitos con citoquinas.

10 El tratamiento de los monocitos con citoquinas aumenta la expresión del receptor Fc de baja afinidad Monocitos elutriados se cultivaron usando citoquinas específicas en medio libre de suero. Los perfiles del receptor Fc se ensayaron usando FACS.

Figura 32 Muerte celular del tumor mejorada usando mutantes Fc en macrófagos derivados de monocitos basado en ADCC.

15 Concentración de MAb Ch4D5 de más de 2 log se probaron usando relación efector: objetivo de 35:1. Se calculó el porcentaje de lisis como en la Fig. 30.

Figura 33 Diagrama de flujo del ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento.

El diagrama de flujo resume los ensayos de CDC usados.

Figura 34 Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento

20 Mutantes Fc que muestran unión a FcγRIIIA mejorada mostraron además actividad del complemento mejorada. Se tituló el ChMAb anti-CD20 más de 3 órdenes de magnitud. Se calculó el porcentaje de lisis como en la Fig. 30.

Figura 35 Árbol de decisión para la selección de mutantes Fc

Un protocolo ilustrativo para la selección de mutantes de Fc

Figura 36 Unión de C1q al anticuerpo 2B6.

25 **A.** El diagrama representa el formato BIAcore para el análisis de la unión de 2B6 al primer componente de la cascada del complemento.

B. Sensograma de tiempo real de la unión del anticuerpo 2B6 que porta regiones Fc variantes a C1q.

Figuras 37 A-D Unión de C1q a anticuerpo 2B6 mutante.

30 Sensograma de unión en tiempo real de mutantes 2B6 a C1q (3.25nM). Los mutantes se representan en MgFc51 (Q419H, P396L); MgFc51/60 en el Panel A; MgFc55 y MgFc55/60 (Panel B), MgFc59 y MgFc59/60 (Panel C); y MgFc31/60 (Panel D).

Figuras 38 A-D Fc Variantes con unión disminuida a FcγRIIB

35 Unión de FcR de anticuerpos ch4D5 para comparar el efecto de D270E (60) en R255L, mutante doble P396L (MgFc55). KDse analizó a diferentes concentraciones de FcR; 400nM CD16A 158V; 800nM CD16A 158F; 200nM CD32B; 200nM CD32A 131H. El análisis se realizó usando K_D separada usando el software Biacore 3000.

Figuras 39 A-D Características cinéticas de mutantes 4D5 seleccionados de reducciones de FcγRIIB/selección FcγRIIAH131

La unión de FcR a anticuerpos ch4D5 que portan diferentes mutaciones de Fc seleccionados por la reducción de CD32B y estrategia de tamizaje de CD32A H131. K_D se analizó a diferentes concentraciones de FcR; 400nM CD16A 158V; 800nM CD16A 158F; 200nM CD32B; 200nM CD32A 131H. El análisis se realizó usando K_D con el software Biacore 3000.

- 5 Figura 40. Gráfico de los datos MDM ADCC contra la K_{OFF} determinada para la unión de CD32A 131H como se determina por biacore.

Los mutantes son los siguientes: MgFc 25 (E333A, K334A, S298A); MgFc68 (D270E); MgFc38 (K392T, P396L); MgFc55 (R255L, P396L); MgFc31 (P247L, N421K); MgFc59(K370E, P396L).

Figuras 41 A-B. Actividad ADCC de los mutantes en un anticuerpo monoclonal quimérico HER2/NEU

- 10 Anticuerpos monoclonales quiméricos HER2/neu que contienen regiones mutantes Fc se evaluaron, por duplicado, para su actividad ADCC y compararon con la actividad ADCC del anticuerpo Her2/neu quimérico tipo silvestre. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc88 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L), MGFc88A (F243L, R292P, Y300L, P396L), MGFc155 (F243L, R292P, Y300L).

Figuras 42 A-B. Peso tumoral estimado en los ratones tratados con h2B6 mutante Fc o tipo silvestre.

- 15 Los ratones desnudos Balb/c se inocularon de forma subcutánea con células Daudi y administraron semanalmente 25µg, 2.5 µg o 0.25 µg de dosis ya sea de h2B6 tipo silvestre (A) o h2B6 que alberga mutante Fc MGFC 0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (B). Los ratones administrados con tampón solo se usaron como control. Se calculó el peso del tumor basado en el volumen estimado del tumor subcutáneo de acuerdo con la fórmula (ancho² X longitud)/2.

- 20 Figuras 43 A-B. Supervivencia en los ratones que albergan tumor tratados con h2B6 tipo silvestre o mutante Fc.

Los ratones desnudos se inocularon con células Daudi y administraron semanalmente 25 µg, 2.5 µg o 0.25 µg dosis ya sea de h2B6 tipo silvestre (A) o h2B6 que alberga mutante Fc MGFc 0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (B). Los ratones administrados con tampón solo se usaron como control.

5. Descripción de las realizaciones preferidas

- 25 La presente invención se relaciona con moléculas, preferentemente polipéptidos, y con mayor preferencia inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyen inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones alteran, por ejemplo, aumentan o disminuyen, la afinidad de la región Fc variante por una FcγR. En algunas realizaciones, la invención comprende modificaciones a la región Fc que incluyen pero sin limitarse a, cualquiera de las modificaciones descritas en la solicitud U.S. No. de Serie 10/754,922 presentada el 9 de Enero de 2004; Solicitud provisional U.S. No. de Serie 60/439,498 presentada el 9 de Enero de 2003; Solicitud provisional U.S. No. de Serie No. 60/456,041 presentada el 19 de Marzo de 2003; Solicitud provisional U.S. No. de Serie 60/514,549 presentada el 23 de Octubre de 2003 y la Solicitud provisional U.S. No. de Serie 60/587,251 presentada el 12 de Julio de 2004. En algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable, es decir, siendo la misma como dicha molécula con una región Fc variante pero que no tiene la una o más modificaciones de aminoácidos, que comprende la región Fc tipo silvestre según se determina por los métodos conocidos para una persona con experiencia en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcγR y métodos descritos en la presente, por ejemplo, un ensayo ELISA o un ensayo de resonancia de plasmón de superficie.

- En una realización preferida, las moléculas de la invención se unen específicamente además a FcγRIIB (a través de la región Fc) con una afinidad inferior que lo que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIB. En algunas realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que une FcγRIIIa y FcγRIIB con una afinidad mayor, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que une FcγRIIB con una afinidad mayor, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. En otras

realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden la región Fc variante de, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que une FcγRIIB con una afinidad reducida, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre.

- 5 En una realización específica, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que solamente une una FcγR, en donde dicho FcγR es FcγIIIa. La invención se refiere en particular a la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-angiogénicos o antiinflamatorios tumorales específicos) para mejorar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos mejorando, por ejemplo, la función efectora de los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, mejorando la ADCC.

- 15 Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos in vitro (ensayos basados en la bioquímica o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón de superficie, ensayos de inmunoprecipitación (Véase Sección 5.2.5.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan además por ensayos funcionales in vitro para determinar una o más funciones celulares efectoras con el mediador FcγR (Véase Sección 5.2.7). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similar en los modelos in vivo (tales como los descritos y divulgados en la presente) como los ensayos basados in vitro. Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en los ensayos basados in vitro pero exhiben in vivo el fenotipo deseado.

- 25 En algunas realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc, que se define como que se extiende desde los aminoácidos 342-447. En otras realizaciones, las moléculas de la invención que comprende una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como que se extiende desde los aminoácidos 231-341. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos, en donde una modificación está en la región CH3 y una modificación está en la región CH2. La invención abarca además la modificación de aminoácidos en la región bisagra. Las moléculas de la invención con una o más modificaciones de aminoácidos en los dominios CH2 y/o CH3 tienen afinidades alteradas por un FcγR como se determinó usando los métodos descritos en la presente o conocidos para una persona con experiencia en la técnica.

En una realización particular, la invención abarca modificación de aminoácidos en el dominio CH1 de la región Fc.

- 35 En realizaciones particularmente preferidas, la invención abarca las moléculas que comprenden una región Fc variante en donde dicha variante tiene una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A) y/o una actividad aumentada ADCC, como se mide usando métodos conocidos para una persona con experiencia en la técnica y ejemplificados en la presente. Los ensayos ADCC usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser NK dependientes o macrófago dependiente.

- 40 Las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc conocidas que incluyen pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora y modificaciones que alteran la afinidad de unión a FcγR. En una realización particular, una Fc variante de la invención que comprende una primera modificación de aminoácido en el dominio CH3, dominio CH2 o la región bisagra pueden combinarse con una segunda modificación Fc de manera que la segunda modificación Fc no está en el mismo dominio que la primera de manera que la primera modificación confiere un aditivo, propiedad sinérgica o nueva en la segunda modificación Fc. En algunas realizaciones, las Fc variantes de la invención no tienen modificación de cualquier aminoácido en el dominio CH2.

- 45 Las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con cualquiera de las modificaciones Fc conocidas en la técnica tales como las descritas en la Tabla 2 más abajo.

TABLA 2

Sustitución(es)
V264A
V264L
V264I
F241W
F241L
F243W
F243L
F241L/F243L/V262I/V264I
F241W/F243W
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/V262I
F243L/V264I
F243L/V262I/V264W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241E/F243R/V262E/V264R
F241E/F243Q/V262T/V264E
F241R/F243Q/V262T/V264R
F241E/F243Y/V262T/V264R
L328M
L328E
L328F
I332E
L328M/I332E
P244H

ES 2 579 602 T3

P245A
P247V
W313F
P244H/P245A/P247V
P247G
V264I/I332E
F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S298A
S298A/I332E
S298A/E333A/K334A
S239E/I332E
S239Q/I332E
S239E
D285G
D285N
S239E/D285G
S239E/D285N
S239E/D285Q
Y298E
Y298Q
S298T
S298N
T299I
A327S
A327N
S287Q/A327S
S287L/A327S
A327L
P329F
A330L
A330Y
I332D
N297S
N297D
N297S/I332E
N297D/I332E
N297E/I332E
D285Y/N297D/I332E
D285Y/N297D/T299L/I332E

ES 2 579 602 T3

D265F/N297E/I332E
L328I/I332E
L329Q/I332E
I332N
I332Q
V264T
V264F
V240I
V263I
V266I
T298A
T299S
T299V
N325Q
N325L
N325I
S239D
S239N
S239F
S239D/I332D
S239D/I332E
S239D/I332N
S239D/I332Q
S239E/I332D
S239E/I332N
S239E/I332Q
S239N/I332D
S239N/I332E
S239N/I332N
S239N/I332Q
S239Q/I332D
S239Q/I332N
S239Q/I332Q
K326E
Y296D
Y296N
F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
A330Y/I332E
V264I/A330Y/I332E
A330L/I332E

V264I/A330L/I332E
L234D
L234E
L234N
L234Q
L234T
L234H
L234Y
L234I
L234V
L234F
L235D
L235S
L235N
L235Q
L235T
L235H
L235Y
L235I
L235V
L235F
S239T
S239H
S239Y
V240A
V240T
V240M
V263A
V263T
V263M
V264M
V264Y
V266A
V266T
V266M
E269H
E269Y
E269F
E269R
Y296S

ES 2 579 602 T3

Y296T
Y296L
Y296I
A296H
T296H
A330V
A330I
A330F
A330R
A330H
N325D
N325E
N325A
N325T
N325V
N325H
L328D/I332E
L328E/I332E
L328N/I332E
L328Q/I332E
L328V/I332E
L328T/I332E
L328H/I332E
L328I/I332E
L328A
I332T
I332H
I332Y
I332A
S239E/V264I/I332E
S239Q/V264I/I332E
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/N297D/I332E

S239E/N297D/I332E
S239D/D285V/N297D/I332E
S239D/D285I/N297D/I332E
S239D/D285L/N297D/I332E
S239D/D285F/N297D/I332E
S239D/D285Y/N297D/I332E
S239D/D285H/N297D/I332E
S239D/D285T/N297D/I332E
V264I/N297D/I332E
Y296D/N297D/I332E
Y296E/N297D/I332E
Y296N/N297D/I332E
Y296Q/N297D/I332E
Y296H/N297D/I332E
Y296T/N297D/I332E
N297D/T296V/I332E
N297D/T296I/I332E
N297D/T296L/I332E
N297D/T296F/I332E
N297D/T296H/I332E
N297D/T296E/I332E
N297D/A330Y/I332E
N297D/S298A/A330Y/I332E
S239D/A330Y/I332E
S239N/A330Y/I332E
S239D/A330L/I332E
S239N/A330L/I332E
V264I/S298A/I332E
S239D/S298A/I332E
S239N/S298A/I332E
S239D/V264I/I332E
S239D/V264I/S298A/I332E
S239D/V264I/A330L/I332E
T256A
K290A
D312A

ES 2 579 602 T3

*K326A
S298A
E333A
K334A
E430A
T356A
K360A
E430A
K320M
K326S
K326N
K326D
K326E
K334Q
K334E
K334M
K334H
K334V
K334L
A330K
T335K
A339T
E333A, K334A
T256A, S298A
T256A, D280A, S298A, T307A
S298A, E333A, K334A S298A, K334A
S298A, E333A
T256A
K290A
K326A
R255A
E258A
S267A

E272A
N276A
D280A
E283A
H285A
N286A
P331A
S337A
H288A
E272A
E430A
A330K
R301M
H288N
H288S
E272Q
N288Q
N288S
N288D
K290S
K320M
K320Q
K320E
K320R
K322E
k326S
K326D
K326E
A330K

ES 2 579 602 T3

T335E
S267A, E258A
S267A, R255A
S267A, D280A
S267A, E272A
S267A, E293A
S267A, E258A, D280A, R255A
P238A
D265A
E269A
D270A
N297A
P329A
A327Q
S239A
E294A
Q295A
V303A
K248A
I253A
T260A
K274A
V282A
K288A
Q311A
K317A
E318A
K338A
K340A
Q342A
R344A
E345A
Q347A
R355A
E356A
M358A
K360A

N361A
Q362A
Y373A
S375A
D376A
E380A
E382A
S383A
N384A
Q386A
E388A
N389A
N390A
Y391A
K392A
L398A
S400A
D401A
D413A
K414A
S415A
R416A
Q418A
Q419A
N421A
V422A
S424A
E430A
H433A
N434A
H435A
Y436A
T437A
Q438A
K439A
S440A

S442A
S444A
K447A
K248M
K248M
Y300F
A330Q
K338M
K340M
A378Q
Y391F

En otras realizaciones, las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con cualquiera de las modificaciones Fc conocidas en la técnica tales como las descritas en las Tablas 3 A y B más abajo.

TABLA 3A

Variante de inicio	Posición 300	Posición 298	Posición 296	Posición 295	Posición 294
Y3001 + →	-	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
Y300L + →	-	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
S298N + →	Y3001, Y300L, o Y300F	-	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
S298V + →	Y3001, Y300L, o Y300F	-	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
S298D + →	Y3001, Y300L, o Y300F	-	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
S298P + →	Y3001, Y300L, o Y300F	-	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
Y298P + →	Y3001, Y300L, or Y300F	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	-	Q295K, Q295L, o Q295A	E294N, E294A, E294Q, o E294D
Q295K + →	Y3001, Y300L, o Y300F	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	Y298P, Y298F, o N278Q	-	E294N, E294A, E294Q, o E294D
Q295L + →	Y3001, Y300L, o Y300F	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	Y298P, Y298F, o N278Q	-	E294N, E294A, E294Q, o E294D
E294N + →	Y3001, Y300L, o Y300F	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L	Y298P, Y298F, o N278Q	Q295K, Q295L, o Q295A	-

** Note que la tabla usa numeración de EU como en Kabat.

TABLA 3B

Variante de inicio	Posición 334	Posición 333	Posición 324	Posición 286	Posición 276
Y3001 + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
Y300L + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
S298N + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
S298V + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
S298D + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
S298P + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
Y298P + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
Q298K + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
Q295L + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o
E294N + →	K334A, K334R, K334Q, K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E33A, E333Q, E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324A, S324N, S324Q, S324K, o S324E.	N286Q, N286S, N286A, N286D.	N276Q, N276A, N276K, o

** Note que la tabla usa la numeración EU como en Kabat.

En una realización específica preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por una FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en la posiciones que realizan un contacto directo con la FcγR basado en análisis cristalográficos y estructurales de las interacciones Fc-FcγR tales como aquellas descritas por Sondermann y otros, 2000 (Nature, 406: 267-273 la cual se incorpora como referencia en la presente en su totalidad). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 de bucle (G/F). En algunas realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que realiza un contacto directo con un FcγR basado en análisis estructural y cristalográfico.

El dominio que interactúa con el FcγR se mapea con la región inferior de la bisagra y se seleccionan los sitios dentro de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG. Los residuos de aminoácidos que flanquean las posiciones de contacto presentes y los residuos de aminoácidos en el dominio CH3 juegan un papel en las interacciones IgG/FcγR como se indica por los estudios de mutagénesis y estudios que usan inhibidores de péptidos pequeños, respectivamente (Sondermann y otros, 2000 Nature, 406: 267-273; Diesenhofer y otros, 1981, Biochemistry, 20:

2361-2370; Shields y otros, 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). El contacto directo, como se usa en la presente, se refiere a los aminoácidos que están dentro de al menos 1 Å, al menos 2 o al menos 3 angstroms uno del otro o dentro de 1 Å, 1.2 Å, 1.5 Å, 1.7 Å o 2 Å de radio de Van Der Waals . Una lista ilustrativa de los sitios previamente identificados en el Fc, que efectúan la unión de proteínas que interactúan con Fc, se enumeran en la Tabla 4 más abajo. En algunas realizaciones, la invención abarca Fc variantes que no tienen ninguna modificación en los sitios enumerados más abajo. En otras realizaciones, la invención abarca Fc variantes que comprenden modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios enumerados más abajo en conjunto con otras modificaciones descritas en la presente de manera que dicha modificación tiene un efecto sinérgico o aditivo en la propiedad del mutante.

5

TABLA 4. SITIOS PREVIAMENTE IDENTIFICADOS EN EL Fc QUE EFECTÚAN LA UNIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON Fc.

10

FcR-Fc	Dominio	Residuo	FcRI	FcRII	FcRIII	C1g	FcRn
	<u>CH2</u>	<u>233</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>234</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>235</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>236</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>237</u>					
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>238</u>	<u>D</u>				
<u>A.B</u>	<u>CH2</u>	<u>239</u>			<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>241</u>	<u>D</u>				
	<u>CH2</u>	<u>243</u>	<u>D</u>				
	<u>CH2</u>	<u>246</u>	<u>D</u>				
	<u>CH2</u>	<u>250</u>					<u>Im</u>
	<u>CH2</u>	<u>254</u>					<u>IC</u>

ES 2 579 602 T3

FcR-Fc	Dominio	Residuo	FcRI	FcRII	FcRIII	C1g	FcRn
	CH2	255		C			
	CH2	256		C	C		
	CH2	258		C			
B	CH2	265	C	C	C	E	C
B	CH2	267		C			
	CH2	268		C	C		
B	CH2	269			C		
	CH2	270		C	C	E	
	CH2	272		C			
	CH2	276		C			
	CH2	285		C			
	CH2	286		C			
	CH2	288					C
	CH2	290		C	C		
	CH2	292		C			
	CH2	293			C		
	CH2	295		C	C		
	CH2	296			C		
B	CH2	297	x	x	x	x	
B	CH2	298					
B	CH2	299					
	CH2	301	D	C	C		
	CH2	311					C
	CH2	312					C
	CH2	315		C			
	CH2	317					C
	CH2	322		C	C	E	
	CH2	326		C		E	
A,B	CH2	327	D,C	C	C		
A	CH2	328					
A	CH2	329	D,C	C	C	F	
A	CH2	330					
	CH2	331		C		F	

FcR-Fc	Dominio	Residuo	FcRI	FcRII	FcRIII	C1g	FcRn
A	CH2	332					
	CH2	333			C	E	
	CH2	334			C		
	CH2	337		C			
	CH2	338			C		
	CH3	339			C		
	CH3	360					C
	CH3	362					C
	CH3	376			C		
	CH3	378		C			
	CH3	380					C
	CH3	382					C
	CH3	414		C			
	CH3	415					C
	CH3	424					C
	CH3	428					E
	CH3	430		C			
	CH3	433					C
	CH3	434					C
	CH3	435					C
	CH3	436					C

La Tabla 4 enumera los sitios dentro de la región Fc que se ha identificado previamente por ser importante para la interacción Fc-FcR. Las columnas marcadas FcR-Fc identifican la cadena Fc contactadas por el FcR. Las letras identifican la referencia en la que se citó la data. C is Shields y otros, 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604; D es Jefferis y otros, 1995, Immunol. Lett. 44: 111-7; E es Hinton y otros; 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6; F es Idusogie y otros, 2000, J. Immunol. 164: 4178-4184.

5 En otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre, siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. En una realización específica, la invención abarca describe en la presente una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre, siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 y no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326, o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335 una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, or arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

5 En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante no tiene o no es solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439 y no tiene una histidina, glutamina, o tirosina en la posición 280; una serina, glicina, treonina o tirosina en la posición 290, una leucina o isoleucina en la posición 300; una asparagina en la posición 294, una prolina en la posición 296; una prolina, asparagina, ácido aspártico, o valina en la posición 298; una lisina en la posición 295. En aún otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad reducida en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, o 439. En aún otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a una FcγR con una afinidad mejorada en relación con una molécula que comprende una región Fc tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, o 430.

20 En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante no incluye o no es solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269, or 328 y no tiene una leucina en la posición 243, una asparagina en la posición 298, una leucina en la posición 241, e isoleucina o una alanina en la posición 240, una histidina en la posición 244, una valina en la posición 330, o una isoleucina en la posición 328.

25 En realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención con afinidades alteradas por receptores activadores y/o inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en donde dicha una o más modificación de aminoácidos es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10) (véase las Tablas 5 & 6); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina, y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina, y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina.

En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 396 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico y en la posición 243 con leucina. En otra realización específica, la molécula comprende además una o más modificación de aminoácidos tal como las descritas en la presente.

50 En algunas realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que tiene una modificación de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 217, 219, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 288, 229, 231, 232, 233, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 273, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 295, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422,

423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446, 447. Preferentemente tales mutaciones resultan en moléculas que tienen una afinidad alterada por un FcγR y/o tienen una función mediada por célula efectora alterada como se determina usando los métodos descritos y ejemplificados en la presente y conocido para una persona con experiencia en la técnica.

- 5 La invención abarca moléculas que comprenden unas regiones Fc variantes que consiste en o que comprenden cualquiera de las mutaciones enumeradas en la tabla más abajo en la Tabla 5.

TABLA 5 MUTACIONES ILUSTRATIVAS

MUTANTES DE UN SOLO SITIO	MUTANTES DE DOBLE SITIO
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S186N
A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S
T386S	R255L, E318K
V379L	F243L, E318K
K288N	V279L, P395S
A330S	K246T, Y319F
F243L	F243I, V379L
E318K	K288M, K334E
V379M	K334E, E308D
S219Y	E233D, K334E
V282M	K246T, P396H
D401V	H288D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
I377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R

ES 2 579 602 T3

MUTANTES DE UN SOLO SITIO	MUTANTES DE DOBLE SITIO
K326E	R255Q, K326E
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q
S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-ELIMINADO
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
R292P	P247L, L406F

MUTANTES DE UN SOLO SITIO	MUTANTES DE DOBLE SITIO
V273	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H288N, P396L
	K326I, P396L
	H288D, P396L
	K210M, P396L
	L358P, P396L
	K334N, P396L
	V379M, P396L
	P227S, P396L
	P217S, P396L
	Q419H, P396L
	K370E, P396L
	L242F, P396L
	R255L, P396L
	V240A, P396L
	T250A, P396L
	P247S, P396L
	L410H, P396L
	Q419L, P396L
	V427A, P396L
	E258D, P396L
	N384K, P396L
	V323I, P396L
	P244H, P396L
	V305L, P396L
	S400F, P396L
	V303I, P396L
	A330V, Q419H
	V283Q, E272D
	K326E, A330T
	F243L, R292P
	F243L, P396L

En aún otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden unas regiones Fc variantes que tiene más de dos modificaciones de aminoácidos. Un ejemplo no limitante de tales variantes se enumera en la tabla más abajo (Tabla 6). La presente descripción abarca mutaciones enumeradas en la Tabla 6 que comprenden además una o más modificaciones de aminoácidos tales como las descritas en la presente.

TABLA 6 VARIANTES DE COMBINACIÓN ILUSTRATIVAS

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H288L, A141V
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205E, F149Y, K133M
S408I, V215I, V125L
G385E, P247H
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T
H310Y, T289A, Y407V, E258D
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M
F243L, R255L, E318K
K334E, T359N, T366S
T256S, V305I, K334E, N390S
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
K334E, T359N, T366S, Q386R
K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
P217S, A378V, S408R
P247L, I253N, K334N
D312E, K327N, I378S
D280E, S354F, A431D, L441I
K218R, G281D, G385R
P247L, A330T, S440G
T355N, P387S, H435Q
P247L, A431V, S442F
P343S, P353L, S375I, S383N
E216D, E345K, S375I
K288N, A330S, P396L
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M

ES 2 579 602 T3

K326Q,K334E,T359N,T366S
A378V,N390I,V422I
V282E,V389I,L406F
V397M,T411A,S415N
T223I,T256S,L406F
L235P,V382M,S304G,V305I,V323I
P247L,W313R,E388G
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L
F243I,V379L,G420V
A231V,Q386H,V412M
T215P,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T
R301H,K340E,D399E
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V
E269K,K290N,Q311R,H433Y
E216D,K334R,S375I
T335N,P387S,H435Q
K246I,Q362H,K370E
K334E,E380D,G446V
V303I,V369F,M428L
K246E,V284M,V308A
E293V,Q265E,A327T
Y319F,P352L,P396L
Y319F,P352L,P396L
D221E,D270E,V308A,Q311H,P396L,G402D
K290T,N390I,P396L
K288R,T307A,K344E,P396L
V273I,K326E,L328I,P396L
K326I,S409N,P396L
K261N,K210M,P396L
F243L,V305I,A378D,F404S,P396L
K290E,V369A,T393A,P396L
K210N,K222I,K320M,P396L
P217S,V305I,I309L,N390H,P396L

K246N, Q419R, P396L
F217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N394K, P396L
A330V, H433Q, V427M
V263Q, E272D, Q419H
N276Y, T393N, W417R
V282L, A330V, H433Y, T436R
V284M, S298N, K334E, R355W
A330V, G427M, K438R
S219T, T225K, D270E, K360R
K222E, V263Q, S298N
E233G, P247S, L306P
S219T, T225K, D270E
S254T, A330V, N361D, P243L
V284M, S298N, K334E, R355W R416T
D270E, G316D, R416G
K392T, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
P247L, N421K, D270E
R292P, V305I
R292P, V305I, F243L
V284M, R292L, K370N
R292P, V305I, P396L
F243L, R292P, Y300L
F243L, R292P, P396L
F243L, R292P, V305L
F243L, Y300L, V305I, P396L
F243L, R292P, V305I, P396L
F243L, R292P, Y300L, P396L
F243I, R292P, Y300L, V305I, P396L

5 En algunas realizaciones, las moléculas, preferentemente las inmunoglobulinas de la invención comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de manera que uno o más porciones de carbohidrato se unen covalentemente a la molécula. Preferentemente, los anticuerpos de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o uno o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpo mejorada, por ejemplo, actividad ADCC mejorada. En algunas realizaciones, la invención comprende además los anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que directamente o indirectamente se conocen por interactuar con una porción de carbohidrato del anticuerpo que incluyen, pero sin limitarse a, aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, y 301. Los aminoácidos que interactúan directamente o indirectamente con una porción de carbohidrato de un anticuerpo se conocen en la técnica véase, por ejemplo, 10 Jefferis y otros, 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

15 La invención abarca los anticuerpos humanizados que se han modificado por la introducción de uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferentemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión a FcγR. Los sitios de glicosilación se pueden introducir en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invención. Como se usa en la presente, "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácido específica en un anticuerpo para el cual un oligosacárido (es decir, carbohidrato, con dos o

más azúcares simples unidos entre sí) se unirá específicamente y covalentemente. Las cadenas laterales de oligosacáridos se enlazan típicamente a la cadena principal de un anticuerpo a través de cualquiera de los enlaces N u O. La glicosilación con enlace N se refiere a la unión de una porción de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación con enlace O se refiere a la unión de una porción de oligosacárido a un ácido hidroxiamino, por ejemplo, serina, treonina. Los anticuerpos de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, que incluyen sitios de glicosilación con enlace N y con enlace O. Cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación con enlace N y con enlace O conocido en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Un sitio de glicosilación con enlace N ilustrativo que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención, es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Un sitio o sitios de ese tipo se puede introducir en un anticuerpo de la invención usando métodos bien conocidos en la técnica a la que pertenece esta invención. Véase, por ejemplo, "In Vitro Mutagenesis," Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, y otros W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116. Un método ilustrativo para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que se obtenga la secuencia deseada Asn-X-Thr/Ser.

En algunas realizaciones, la invención abarca métodos para modificar el contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención añadiendo o eliminando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos se conocen bien en la técnica y se abarcan por la invención, Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 6,218,149; EP 0 359 096 B1; publicación Estados Unidos núm. US 2002/0028486; WO 03/035835; publicación Estados Unidos núm. 2003/0115614; patente de los Estados Unidos núm. 6,218,149; patente de los Estados Unidos núm. 6,472,511. En otras realizaciones, la invención abarca métodos para modificar el contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención mediante la eliminación de una o más porciones de carbohidrato endógeno del anticuerpo. En una realización específica, la invención abarca cambiar el sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando las posiciones adyacentes a 297. En una realización específica, la invención abarca modificar la posición 296 de manera que la posición 296 y no la posición 297 es glicosilada.

5.1 Polipéptidos y anticuerpos con regiones Fc variantes

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de las regiones Fc de la cadena pesada de IgG1 humano mutante, con afinidades alteradas para diferentes receptores FcγR, usando un sistema de exposición en levadura. En consecuencia, la invención se relaciona con moléculas, preferentemente polipéptidos, y con mayor preferencia inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprende una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero incluyen además inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante por una FcγR.

Se apreciará por una persona con experiencia en la técnica que aparte de sustituciones de aminoácidos, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región Fc para generar una región Fc variante con una o más propiedades alteradas, por ejemplo, función efectora alterada. La invención contempla la eliminación de uno o más residuos de aminoácido de la región Fc para reducir la unión a un FcγR. Preferentemente, no más de 5, no más de 10, no más de 20, no más de 30, no más de 50 residuos de la región Fc se eliminarán de acuerdo con esta Realización de la invención. La región Fc de la presente que comprende uno o más eliminaciones de aminoácidos retendrá preferentemente al menos aproximadamente 80 %, y preferentemente al menos aproximadamente 90 %, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 %, de la región Fc tipo silvestre. En algunas realizaciones, una o más propiedades de las moléculas se mantienen tales como por ejemplo, no inmunogenicidad, unión a FcγRIIIA, unión a FcγRIIA, o una combinación de estas propiedades.

En realizaciones alternativas, la invención abarca inserción de aminoácidos para generar las regiones Fc variantes, cuyas variantes tienen propiedades alteradas que incluyen la función efectora alterada. En una realización específica, la invención abarca introducir al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo de uno a dos residuos de aminoácidos y preferentemente no más de 10 residuos de aminoácidos adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc identificada en la presente. En realizaciones alternativas, la invención abarca además introducir al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo de uno a dos residuos de aminoácidos y preferentemente no más de 10 residuos de aminoácidos adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc conocida en la técnica como que impactan en la interacción y/o unión a FcγR.

La invención abarca además la incorporación de aminoácidos no naturales para generar las Fc variantes de la invención. Tales métodos son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica tales como los que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, Véase, por ejemplo, Wang y otros, 2002 Chem. Comm. 1: 1-11; Wang y otros, 2001, Science, 292: 498-500; van Hest y otros, 2001. Chem. Comm. 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se enfocan en las enzimas responsables de la

biosíntesis de amino acil-ARNt., Véase, por ejemplo, Tang y otros, 2001, J. Am. Chem. 123(44): 11089-11090; Kück y otros, 2001, FEBS Lett. 505(3): 465.

5 Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención por un FcyR se determinan inicialmente usando ensayos in vitro (ensayos basados en bioquímica o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcyR, es decir, la unión específica de una región Fc para un FcyR que incluye pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón de superficie, ensayos de inmunoprecipitación (Véase Sección 5.2.5.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan además por ensayos funcionales in vitro para determinar una o más funciones celulares efectoras con el mediador FcyR (Véase Sección 5.2.7). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similar en los modelos in vivo (tales como los descritos y divulgados en la presente) como los ensayos con base in vitro. Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en los ensayos basados in vitro pero exhiben in vivo el fenotipo deseado. Un diagrama de flujo representativo del tamizaje y caracterización de moléculas de la invención se describe en la Fig. 35.

15 La invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que se une con una mayor afinidad a una o más FcyRs. Tales moléculas preferentemente median la función efectora más eficazmente como se discute más abajo. En otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que se unen con una afinidad más débil a uno o más FcyRs. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en ciertos casos por ejemplo en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica bloquear o el antagonismo pero sin destruir las células que contiene un antígeno objetivo. La reducción o eliminación de la función efectora sería deseable en los casos de enfermedad autoinmune donde uno puede bloquear los receptores activadores FcyR en las células efectoras (Este tipo de función puede estar presente en las células huésped). La función efectora aumentada generalmente se puede dirigir al tumor y las células extrañas.

25 Las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc, que incluyen pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar una Fc variante de la invención con otras modificaciones Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o nuevas en los anticuerpos o fusiones Fc. Preferentemente las Fc variantes de la invención mejoran el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una Fc variante de la invención se combina con un mutante conocido para unir FcyRIIIA con una alta afinidad que la de una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre; la combinación con un mutante de la invención resulta en una mejoría mucho mayor en la afinidad FcyRIIIA.

30 En una realización, las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con otras Fc variantes conocidas tales como las descritas en Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564; Lund y otros, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre y otros, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins y otros, 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis y otros, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund y otros, 1995, FASEB J 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y otros, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie y otros, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie y otros, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

40 En algunas realizaciones, las Fc variantes de la presente invención se incorporan en un anticuerpo o fusión Fc que comprende una o más glicoformas manipuladas genéticamente, es decir, una composición de carbohidrato que se une covalentemente a una molécula que comprende una región Fc, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de aquella de una molécula raíz que comprende una región Fc. Las glicoformas manipuladas genéticamente pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen pero sin limitarse a, aumentar o reducir la función efectora. Las glicoformas manipuladas genéticamente pueden generarse por cualquier método conocido para una persona con experiencia en la técnica, por ejemplo usando cepas de expresión variantes o manipuladas genéticamente, por co-expresión con uno o más enzimas, por ejemplo D1 N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT11), expresando una molécula que comprende una región Fc en varios organismos o líneas celulares de varios organismos, o por modificación de los carbohidrato(s) después que la molécula que comprende la región Fc se ha expresado. Los métodos para generar glicoformas manipuladas genéticamente se conocen en la técnica, e incluyen pero sin limitarse a los descritos en Umana y otros, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies y otros, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología otiligent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). See, por ejemplo, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki y otros, 2004, JMB, 336: 1239-49.

Las Fc variantes de la presente invención pueden optimizarse para una variedad de propiedades. Las propiedades que se pueden optimizar incluyen pero sin limitarse a afinidad mejorada o reducida por un FcγR, función efectora mejorada o reducida. En una realización preferida, las Fc variantes de la presente invención se optimizan para poseer afinidad mejorada para un activador FcγR humano preferentemente FcγR, FcγRIIA, FcγRIIc, FcγRIIIA, y FcγRIIIB, con la máxima preferencia FcγRIIIA. En una realización preferida alternativa, las Fc variantes se optimizan para poseer afinidad reducida para el receptor inhibitor humano FcγRIIB. Estas realizaciones preferidas se anticipan para proporcionar anticuerpos y fusiones Fc con propiedades terapéuticas mejoradas en los humanos, por ejemplo función efectora mejorada y mayor potencia contra el cáncer como describe y ejemplifica en la presente. Estas realizaciones preferidas se anticipan para proporcionar anticuerpos y fusiones Fc con eliminación mejorada del tumor en modelos de tumores de xenoinjertos en ratón.

En una realización alternativa las Fc variantes de la presente invención se optimizan para tener afinidad reducida para un FcγR humana, que incluye pero sin limitarse a, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIc, y FcγRIIIB. Estas realizaciones se anticipan para proporcionar anticuerpos y Fc fusiones con propiedades terapéuticas mejoradas en humanos, por ejemplo función efectora reducida y toxicidad reducida.

En realizaciones alternativas las Fc variantes de la presente invención posee afinidad reducida para FcγRs de organismos no humanos, que incluyen pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos y monos. Fc variantes que se optimizan para la unión a un FcγR no humano pueden encontrar uso en la experimentación. Por ejemplo, los modelos de ratón están disponibles para una variedad de enfermedades que permiten pruebas de propiedades tales como la eficacia, toxicidad, y farmacocinética de un determinado candidato a fármaco. Como se conoce en la técnica, las células cancerosas se pueden injertar o inyectar en ratones para imitar un cáncer humano, un proceso conocido como xenoinjerto. Pruebas de anticuerpos o fusiones Fc que comprenden Fc variantes que se optimizan para uno o más FcγRs de ratón, pueden proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia del anticuerpo o fusión Fc, su mecanismo de acción.

Aunque se prefiere alterar la unión a un FcγR, la presente invención contempla además Fc variantes con afinidad de unión alterada al receptor neonatal (FcRn). Aunque no pretende estar ligado a un mecanismo de acción particular, la región Fc variantes con afinidad mejorada para FcRn se anticipan para tener vidas medias en suero más largas, y tales moléculas tendrán aplicaciones útiles en los métodos para tratar mamíferos donde se desea larga vida media del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad crónica o trastorno. Aunque no pretende estar ligado a un mecanismo de acción particular, la región Fc variantes con afinidad de unión disminuida a FcRn, por el contrario, se espera que tengan vidas medias más cortas, y tales moléculas se pueden, por ejemplo, administrar a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, por ejemplo, para la formación de imágenes de diagnóstico in vivo o para polipéptidos que tienen efectos secundarios tóxicos cuando se deja que circule en el torrente sanguíneo durante períodos prolongados. Las variantes de región Fc con afinidad de unión disminuida a FcRn se esperan que sean menos probable que crucen la placenta, y así se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

En otras realizaciones, estas variantes pueden combinarse con otras modificaciones Fc conocidas con afinidad a FcRn alterada tal como la descrita en la Publicación Internacional con núms. WO 98/23289; y WO 97/34631; y Patente de Estados Unidos con núm. 6,277,375.

La invención abarca cualquier otro método conocido en la técnica para generar anticuerpos que tienen una vida media aumentada in vivo, por ejemplo, por la introducción de una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o sus fragmentos de unión FcRn (preferiblemente un Fc o fragmento del dominio Fc de bisagra). Véase, por ejemplo, Publicación Internacional con núms. WO 98/23289; y WO 97/34631; y Patente de Estados Unidos con núm. 6,277,375. Además, los anticuerpos de la invención se pueden conjugar a la albúmina para hacer el anticuerpo o fragmento de anticuerpo más estable in vivo o tener vida media más larga in vivo. Las técnicas bien conocidas en la materia, véase, por ejemplo, Publicación Internacional con núms. WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137, y la Patente Europea con núm. EP 413,622.

La(s) variante(s) descrita(s) en la presente se puede(n) someter a otras modificaciones, muchas veces dependiendo del uso pretendido de la variante. Tales modificaciones pueden implicar además alteración adicionalmente de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o eliminación de residuos de aminoácido), fusión de polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Tales modificaciones adicionales se pueden hacer antes de, simultáneamente con, o a continuación de la modificación(es) de aminoácidos descrita(s) en la presente que resulta en propiedades alteradas tales como una alteración de la unión al receptor Fc y/o actividad ADCC.

Alternativamente o adicionalmente, la invención abarca combinar modificaciones de aminoácidos descritas en la presente con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que alteran la unión de C1q y/o función de citotoxicidad dependiente de complemento de la región Fc como se determina in vitro e/o in vivo. Preferentemente,

la molécula inicial de particular interés en la presente es por lo general una que se une a C1q y muestra citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácidos adicionales descritas en la presente podrán por lo general servir para alterar la capacidad de la molécula inicial para unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y preferentemente abolir estas funciones efectoras. En otras realizaciones se contemplan en la presente las moléculas que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con función de unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mejorada. Por ejemplo, la molécula inicial puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar CDC y se puede modificar de acuerdo con las enseñanzas de la presente de manera que adquiera otras funciones efectoras. Además, las moléculas con actividad de unión a C1q preexistente, que tienen además opcionalmente la capacidad de mediar CDC se pueden modificar de manera que una o ambas de estas actividades se alteran, por ejemplo, mejoran. En algunas realizaciones, la invención abarca regiones Fc variantes con actividad CDC alterada sin ninguna alteración en la unión a C1q. En aún otras realizaciones, la invención abarca regiones Fc variantes con actividad CDC alterada y unión a C1q alterada.

Para generar una región Fc con función alterada de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o unión a C1q, las posiciones de los aminoácidos que se modifican se seleccionan generalmente de las posiciones 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333, y 334, donde la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice UE como en Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. (199). Estas modificaciones de aminoácidos pueden combinarse con uno o más modificaciones Fc descritas en la presente para proporcionar un efecto sinérgico o aditivo en la unión a C1q y/o actividad CDC. En otras realizaciones, la invención abarca Fc variantes con función alterada de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o unión a C1q que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 255 con leucina; o una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 419 con histidina; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 370 con ácido glutámico; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 240 con alanina; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 392 con treonina; una sustitución de aminoácido en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina. La invención abarca cualquier modificación conocida de la región Fc que altera función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o unión a C1q tal como la descrita en Idusogie y otros, 2001, *J. Immunol.* 166(4) 2571-5; Idusogie y otros, *J. Immunol.* 2000 164(8): 4178-4184.

Como se describió anteriormente, la invención abarca una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, unión a C1q y/o unión a FcR modificada y de ese modo actividad CDC y/o actividad ADCC alterada. En realizaciones específicas, la invención abarca regiones Fc variantes con unión a C1q mejorada y unión a FcγRIII mejorada; por ejemplo que tiene tanto actividad ADCC mejorada como actividad CDC mejorada. En realizaciones alternativas, la invención abarca una región Fc variante con actividad CDC reducida y/o actividad ADCC reducida. En otras realizaciones, uno puede aumentar solamente una de esas actividades, y opcionalmente reducir además la otra actividad, por ejemplo para generar una región Fc variante con actividad ADCC mejorada, pero actividad CDC reducida y viceversa.

A. Mutantes con afinidades alteradas mejoradas por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA

La invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante para un activador FcγR. En algunas realizaciones, la moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y preferiblemente también para FcγRIIA por al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En otra realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y preferiblemente también para FcγRIIA por más de 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención la una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y preferiblemente también para FcγRIIA por al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En aún otras realizaciones de la invención la una o más modificaciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA por al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. Tales aumentos en veces se determinan preferentemente por un ELISA o ensayos de resonancia de plasmón de superficie. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 329, 331, o 322 con cualquier aminoácido. En ciertas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son solamente una sustitución con

- 5 cualquiera de alanina en las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, o 430; con lisina en la posición 330; con treonina en la posición 339; con metionina en la posición 320; con serina, asparagina, ácido aspártico, o ácido glutámico en la posición 326 con glutamina, ácido glutámico, metionina, histidina, valina, o leucina en la posición 334. En otra realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son solamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 290, 300, 294, o 295. En otra realización más específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son solamente una sustitución en la posición 300 con leucina o isoleucina; en la posición 295 con lisina; en la posición 294 con asparagina; en la posición 298 con valina; ácido aspártico prolina, asparagina, o valina; en la posición 280 con histidina, glutamina o tirosina; en la posición 290 con serina, glicina, treonina o tirosina.
- 10 En otra realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 15 286, 331, 337, 268, 272, o 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301. En una realización específica las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que 20 tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA por al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En otra realización específica las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA por más de 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención la una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA por al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, o 10 veces en 25 relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre
- 30 En una realización específica, la invención abarca moléculas, preferentemente polipéptidos, y con mayor preferencia inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones pero también incluyen inserciones o eliminaciones), cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIA y preferiblemente también para FcγRIIA por al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 150 %, y al menos 200 %, en relación con una molécula comparable que 35 comprende una región Fc tipo silvestre.
- 40 En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que ueden aumentan la afinidad de la región Fc variante por uno o más FcγRs activadores comprenden una sustitución en la posición 347 con histidina, y en la posición 339 con valina; o una sustitución en la posición 425 con isoleucina y en la posición 215 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina, y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, 45 en la posición 202 con metionina, y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 275 con isoleucina, en la posición 334 con asparagina, y en la posición 348 con metionina; o una sustitución en la posición 279 con leucina y en la posición 395 con serina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 319 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 255 con leucina y en la posición 318 con lisina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 380 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 256 50 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 390 con serina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina, en la posición 394 con metionina, y en la posición 424 con leucina; o una sustitución en la posición 233 con ácido aspártico y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, en la posición 366 con serina, y en la posición 386 con arginina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina, y en la posición 408 con 60 arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina, y en la posición 334

con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina, y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 234 con leucina. Los ejemplos de otras sustituciones de aminoácidos que resultan en una afinidad mejorada por FcR111a in vitro se describen a continuación y se resumen en la Tabla 5.

La invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 255 con leucina de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1 vez más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En un ejemplo específico, la descripción abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 3 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1 vez más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 2.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 247 con leucina, y en la posición 421 con lisina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 3 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 4.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico, y en la posición 327 con treonina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 1.5 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre que se une a FcγR111A, determinado por un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγR111A con aproximadamente una afinidad 2 veces más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc tipo

comprende la región Fc tipo silvestre, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 300 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 305 con isoleucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 273 con fenilalanina.

En una realización específica, la invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2 veces mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 379 con metionina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1.5 veces mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 248 con metionina.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención tienen una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA como se determina usando ensayos in vitro (ensayos con base bioquímica o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a una FcγR que incluyen pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón de superficie, ensayos de inmunoprecipitación (Véase Sección 5.2.5.1). Preferentemente, las propiedades de unión de estas moléculas con afinidades alteradas para los receptores activadores FcγR se correlacionan además con su actividad según lo determinado por ensayos funcionales in vitro para determinar una o más funciones celulares efectoras con el mediador FcγR (Véase Sección 5.2.7), por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con afinidad mejorada por una FcγRIIIA tienen una actividad ADCC mejorada. En realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención que tienen una propiedad de unión alterada para un receptor activador Fc, por ejemplo, FcγRIIIA en un ensayo in vitro tiene además una propiedad de unión alterada en modelos in vivo (tales como los descritos y divulgados en la presente). Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiben una unión alterada a FcγR en ensayos basados in vitro pero no exhiben el fenotipo deseado in vivo.

40 B. Mutantes con afinidad mejorada por una FcγRIIIA y reducida o ninguna afinidad por una FcγRIIB

En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones) en una o más regiones, cuyas una o más modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y disminuye la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIIA y FcγRIIB con afinidad tipo silvestre. En una cierta realización, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son solamente una sustitución con alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333, 334, 280, 290, 294, 298, or 296; o una sustitución en la posición 298 con asparagina, valina, ácido aspártico, or prolina; o una sustitución 290 con serina. En ciertas realizaciones amino, la una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA por al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 300 %, al menos 400 % y disminuye la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB por al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 300 %, al menos 400 %.

En una realización específica, la molécula de la presente invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por una FcγRIIIA y una afinidad disminuida o ninguna afinidad por una FcγRIIB, determinado en base a un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón de superficie usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante

comprende una sustitución en la posición 275 con isoleucina, en la posición 334 con asparagina, y en la posición 348 con metionina; o una sustitución en la posición 279 con leucina y en la posición 395 con serina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 319 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 255 con leucina, y en la posición 318 con lisina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 380 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 256 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 334 con ácido glutámico, y en la posición 390 con serina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina, en la posición 394 con metionina y en la posición 424 con leucina; o una sustitución en la posición 233 con ácido aspártico y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, en la posición 366 con serina y en la posición 386 con arginina; o una sustitución en la posición 312 con ácido glutámico, en la posición 327 con asparagina, y en la posición 378 con serina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina y en la posición 326 con asparagina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina; o una sustitución en la posición 298 con asparagina y en la posición 381 con arginina; o una sustitución en la posición 280 con ácido glutámico, en la posición 354 con fenilalanina, en la posición 431 con ácido aspártico, y en la posición 441 con isoleucina; o una sustitución en la posición 255 con glutamina y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 218 con arginina, en la posición 281 con ácido aspártico y en la posición 385 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 330 con treonina y en la posición 440 con glicina; o una sustitución en la posición 284 con alanina y en la posición 372 con leucina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 387 con serina y en la posición 435 con glutamina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 431 con valina y en la posición 442 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina; o una sustitución en la posición 292 con prolina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina.

En una realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por una FcyRIIIA and una afinidad disminuida o ninguna afinidad por una FcyRIIB determinado en base a un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20 que porta la región Fc variante comprende una sustitución en la posición 379 con metionina; en la posición 219 con tirosina; en la posición 282 con metionina; en la posición 401 con valina; en la posición 222 con asparagina; en la posición 334 con isoleucina; en la posición 334 con ácido glutámico; en la posición 275 con tirosina; en la posición 398 con valina. En aún otra realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por una FcyRIIIA y una afinidad disminuida o ninguna afinidad por una FcyRIIB determinado en base a un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón de superficie usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con leucina; en la posición 292 con prolina; y en la posición 300 con leucina.

La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcyRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcyRIIB con aproximadamente una afinidad 10-15 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcyRIIB con aproximadamente una afinidad 10 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcyRIIB con aproximadamente una afinidad 7 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en

5 donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 5 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 2 veces inferior que un polipéptido comparable que comprende la región Fc tipo silvestre determinado por un ensayo ELISA, en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina.

C Mutantes con afinidad mejorada a FcγRIIIA y FcγRIIB

20 La invención abarca moléculas que comprenden regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA y FcγRIIB por al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 300 %, al menos 400 % y disminuye la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB por al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 300 %, al menos 400 %. En una realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por una FcγRIIIA y una afinidad mejorada por una FcγRIIB (determinado en base a un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón de superficie usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante como se describe en la presente) comprende una sustitución en la posición 415 con isoleucina y en la posición 251 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico, en la posición 292 con leucina, y en la posición 185 con metionina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina, y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, en la posición 202 con metionina y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina, y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina, y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 343 con serina, en la posición 353 con leucina, en la posición 375 con isoleucina, en la posición 383 con asparagina; o una sustitución en la posición 394 con metionina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 216 con ácido aspártico, en la posición 345 con lisina y en la posición 375 con isoleucina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 389 con glicina; o una sustitución en la posición 222 con asparagina, en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 290 con treonina y en la posición 371 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 398 con glutamina; o una sustitución en la posición 326 con glutamina; en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 378 con valina, en la posición 390 con isoleucina y en la posición 422 con isoleucina; o una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico y en la posición 385 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 282 con ácido glutámico, en la posición 369 con isoleucina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 397 con metionina; en la posición 411 con alanina y en la posición 415 con asparagina; o una sustitución en la posición 223 con isoleucina, en la posición 256 con serina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 298 con asparagina y en la posición 407 con

5 arginina; o una sustitución en la posición 246 con arginina, en la posición 298 con asparagina, y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 235 con prolina, en la posición 382 con metionina, en la posición 304 con glicina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 323 con isoleucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 313 con arginina, y en la posición 388 con glicina; o una sustitución en la

10 posición 221 con tirosina, en la posición 252 con isoleucina, en la posición 330 con glicina, en la posición 339 con treonina, en la posición 359 con asparagina, en la posición 422 con isoleucina, y en la posición 433 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con ácido aspártico, y en la posición 384 con lisina; o una sustitución en la posición 241 con leucina y en la posición 258 con glicina; o una sustitución en la posición 370 con asparagina y en la posición 440 con asparagina; o una sustitución en la posición 317 con asparagina and a eliminación en la posición

15 423; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina; o una sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 290 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 231 con valina, en la posición 386 con histidina, y en la posición 412 con metionina; o una sustitución en la posición 215 con prolina, en la posición 274 con asparagina, en la posición 287 con glicina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 365 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico y en la posición 327 con treonina; o una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina; y una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con treonina, en la posición 390 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 326 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una

20 sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 358 con prolina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 288 con arginina, en la posición 307 con alanina, en la posición 344 con ácido glutámico, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con isoleucina, en la posición 326 con ácido glutámico, en la posición 328 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una

25 sustitución en la posición 326 con isoleucina, en la posición 408 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 379 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 261 con asparagina, en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una

30 sustitución en la posición 419 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 242 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 255 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 250 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con serina y en la posición 396 con

35 leucina; o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 419 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 427 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 323 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina y en la posición

40 396 con leucina; o una sustitución en la posición 305 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 400 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 303 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con ácido glutámico, en la posición 369 con alanina, en la posición 393 con

45 alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con asparagina, en la posición 222 con isoleucina, en la posición 320 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 309 con leucina, en la posición 390 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con asparagina; en la posición 419 con arginina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con alanina, en la posición 359 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 215 con isoleucina, en la posición 290 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 275 con leucina, en la posición 362 con histidina, en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina; o una

50 sustitución en la posición 400 con prolina; o una sustitución en la posición 407 con isoleucina; o una sustitución en la posición 372 con tirosina; o una sustitución en la posición 366 con asparagina; o una sustitución en la posición 414 con asparagina; o una sustitución en la posición 352 con leucina; o una sustitución en la posición 225 con serina; o una sustitución en la posición 377 con asparagina; o una sustitución en la posición 248 con metionina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la

60 posición 243 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina.

D. Mutantes con funciones efectoras alteradas mediadas por FcyR

- La invención abarca inmunoglobulina que comprende variantes Fc con funciones efectoras alteradas. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes Fc median la función efectora más eficazmente en presencia de células efectoras determinado mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en la presente descripción. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes Fc median la función efectora menos eficazmente en presencia de células efectoras determinado mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en la presente descripción. En realizaciones específicas, las variantes Fc de la invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc conocidas que alteran la función efectora, de manera que la combinación tiene un efecto sinérgico, aditivo. Las variantes Fc de la invención tienen una función efectora alterada *in vitro* y/o *in vivo*.
- En una realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente por FcγRIIA tienen una función efectora mediada por FcγR mejorada determinada mediante el uso de ensayos de actividad ADCC descritos en la presente descripción. Ejemplos de funciones efectoras que se pueden mediar por las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitarse a, unión de C1q, citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, etc. Las funciones efectoras de las moléculas de la invención se pueden ensayar usando métodos estándar conocidos en la técnica, cuyos ejemplos se describen en la sección 5.2.6. En una realización específica, las inmunoglobulinas de la invención que comprenden una región Fc variante con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA median la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) 2 veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención que comprende una región Fc variante con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA median la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10^4 veces, al menos 10^5 veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre. En otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen actividad de unión a C1q alterada. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10^4 veces, al menos 10^5 veces más alta actividad de unión a C1q que una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre. En otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen citotoxicidad dependiente del complemento. Aún en otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen una citotoxicidad dependiente del complemento mejor que una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10^4 veces, al menos 10^5 veces más alta citotoxicidad dependiente del complemento que una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre.
- En otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen una actividad de fagocitosis mejorada en relación con una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre, determinado por ensayos estándar conocidos para una persona con experiencia en la técnica o descritos en la presente. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces una actividad de fagocitosis más alta en relación con una inmunoglobulina que comprende una región Fc tipo silvestre.
- En una realización específica, la invención abarca una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante con una o más modificaciones de aminoácidos, con una afinidad mejorada por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA tal que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o fagocitosis. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA y aumentan la actividad ADCC de la inmunoglobulina comprenden una sustitución en la posición 379 con metionina; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 leucina y en la posición 255 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 292 con leucina; o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina; o una sustitución en la posición 248 con metionina; o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la

- 5 posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico, y en la posición 327 con treonina; o una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina.

En otra realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la actividad ADCC de la inmunoglobulina es cualquiera de las mutaciones enumeradas más abajo, en la Tabla 7.

TABLA 7 MODIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS QUE AUMENTAN LA ADCC

E333A, K334A
R292L, K334E
V379M
S219Y
V282M
K222N
F243I, V379L
F243L, R255L, E318K
K334I
K334E, T359N, T366S
K288M, K334E
K288N, A330S, P396L
K326E
G318D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
F243I, V379L, G420V
E293V, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L
IC392T, P396L
K248M
H268N, P396L
K290T, N390I, P396L
K326I, P396L
H268D, P396L
K210M, P396L
L358P, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K334N, P396L
V379M, P396L
P227S, P396L
P217S, P396L
K261N, K210M, P396L
Q416H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
R255L, P396L

V240A, P396L
T250S, P396L
P247S, P396L
K290E, V389A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
LA10H, P396L
Q419L, P396L
V427A, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
E255D, P396L
N384K, P396L
V323I, P396L
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
P244H, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L
D270E, G318D, R416G
P247L, N421K
P247L, N421K, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
K392T, P396L, D270E
F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L
F243L, R292P, Y300L, P396L
F243L, R292P, Y300L

5 Alternativamente o adicionalmente, puede ser útil combinar las modificaciones de aminoácidos anteriormente o cualquier otra modificaciones de aminoácidos descritas en la presente descripción con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que alteran la función de citotoxicidad dependiente del complemento y/o de unión a C1q de la región Fc. La molécula de inicio de particular interés en la presente descripción es usualmente una que se une a C1q y exhibe citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las otras sustituciones de aminoácido descritas en la presente descripción servirán generalmente para alterar la capacidad de la molécula de inicio a unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y preferentemente abolir estas funciones efectoras. Sin embargo, las moléculas que comprenden sustituciones en una o más de las 10 posiciones descritas con función mejorada de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o unión a C1q se contemplan en la presente descripción. Por ejemplo, la molécula de inicio puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar CDC y puede modificarse de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción de manera que adquiera estas otras funciones efectoras. Además, las moléculas con actividad de unión a C1q preexistente, que tienen además opcionalmente la capacidad de mediar CDC se pueden modificar tal que una o ambas de estas 15 actividades se mejoran.

20 Como se describió anteriormente, se puede diseñar una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, mediante la modificación de la unión de C1q y/o unión de FcR y el cambio de ese modo de la actividad CDC y/o actividad ADCC. Por ejemplo, se puede generar una región Fc variante con unión mejorada de C1q y unión FcγRIII mejorada; por ejemplo, que tiene tanto actividad ADCC mejorada como actividad CDC mejorada. Alternativamente, donde se desea que la función efectora se reduzca o remueva, se puede manipular genéticamente una región Fc

variante con actividad CDC reducida y/o actividad ADCC reducida. En otras realizaciones, uno puede aumentar solamente una de esas actividades, y opcionalmente reducir además la otra actividad, por ejemplo, generar una región Fc variante con actividad ADCC mejorada, pero actividad CDC reducida y vice versa.

5 La invención abarca variantes específicas de la región Fc que se han identificado usando los métodos de la invención a partir de una genoteca de levadura de mutantes después de las 2da-4ta-ronda de clasificación y se enumeran en la Tabla 8. La Tabla 8 resume los varios mutantes que se identificaron usando los métodos de la invención. Los mutantes se ensayaron usando un ensayo ELISA para determinar la unión a FcγRIIIA y FcγRIIB. Los mutantes se probaron además en un ensayo ADCC, mediante la clonación de las variantes Fc dentro de un anticuerpo ch 4-4-20 usando los métodos descritos y ejemplificados en la presente descripción. Los elementos en
 10 **negrita** se refieren a experimentos, en los que los ch4-4-20 se purificaron previo al ensayo ADCC. La concentración de anticuerpos usada estaba en el intervalo de 0.5 µg/ml - 1.0 µg/ml.

TABLA 8: MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LA REGIÓN Fc

Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis relativa) (Mut/Wt)
Tamizaje FACS genoteca pYD-CH1 con tetramero 3A				
G347H; A339V	CH3	↑0.5x	NT	
S415; L251F	CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.82
K392R	CH3	N/C	NT	
D399E; R292L; V185M	CH1,CH2,CH3	N/C	↑0.5x	0.65 0.9
K290E; L142P	CH1, CH2	N/C	NT	
R301C; M252L; S192T	CH1,CH2	↓.5x	NT	
P291S; K288E; H268L; A141V	CH1,CH2	↓.5x	NT	
N31S	CH2	N/C	↑.75x	
S132I	CH1	N/C	NT	
S383N; N383K; T268N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M	AI	↑0.5x	NT	
S408; V215I; V125L	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.62
P396L	CH3	↑1x	↑1x	0.55
G385E; P247H;	CH2, CH3	↑1x	↑.75x	0.44
P396H	CH3	↑1x	↑1x	0.58
A167V	CH1	N/C	NT	

ES 2 579 602 T3

Y348M; K334N; F275I; Y202M; K147T	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.33
H310Y; T289A; G337E	CH2	↑.5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D	CH1,CH2,CH3	N/C	N/C	0.29
K409R; S166N	CH1, CH3	N/C	NT	
Mutantes sitio dirigidos in vivo				
R292L	CH2	NT	NT	0.82
T359N	CH3	NT	NT	1.06
T396S	CH3	NT	NT	0.93
E333A, K334A	CH2	NT	NT	1.41
R292L, K334E	CH2	NT	NT	1.41; 1.64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3	NT	NT	0.89; 1.15
Y379L	CH3	NT	NT	0.83
K268N	CH2	NT	NT	0.78
A330S	CH2	NT	NT	0.52
F243L	CH2	NT	NT	0.38
E318K	CH2	NT	NT	0.66
K268N, A330S	CH2	NT	NT	0.08
R255L, E318K	CH2	NT	NT	0.82
F243L, E318K	CH2	NT	NT	0.07
Mutantes en la mini-genoteca 4-4-20 aumentaron la unión a FcγRIIIA, disminuyeron o no cambiaron la unión a FcγRIIB N/C significa sin cambio; N/B significa sin unión; NT significa no probado				
V379M	CH3	↑2x	N/C	1.47
S210Y	Hinge	↑1x	↓ o N/B	1.28
Y282M	CH2	↑1x	↓ o N/B	1.25; 1
F275I, K334N, V348M	CH2	↑0.5x	N/C	
D401V	CH3	↑0.5x	N/C	
Y279L, P396S	CH2	↑1x	N/C	
K222N	Hinge	↑1x	↓ o N/B	1.33; 0.63
K246T, Y319F	CH2	↑1x	N/C	
F243I, V379L	CH2, CH3	↑1.5x	↓ o N/B	1.86; 1.35
F243L, R255L, E318K	CH2	↑1x	↓ o N/B	1.81; 1.45

Mutantes en la mini-genoteca 4-4-20 aumentaron la unión a FcγRIIIA, disminuyeron o no cambiaron la unión a FcγRIIB				
NIC significa sin cambio; N/B significa sin unión; NT significa no probado				
K334I	CH2	↑1x	NIC	2.1; 1.97
K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑1.5x	NIC	1.49; 1.45
K288M, K334E	CH2	↑3x	↓0 N/B	1.61; 1.69
K334E,E380D	CH2,CH3	↑1.5x	NIC	
T256S,V395I,K334E,N390S	CH2,CH3	↑1.5x	NIC	
K334E	CH2	↑2.5x	NIC	1.76; 2.18
T335N,K370E,A378V,T394M,S424L	CH2,CH3	↑0.5x	NIC	
E233D,K334E	CH2	↑1.5x	NIC	0.94; 1.02
K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	↑1x	NIC	
Unión aumentada a FcγRIIIA y FcγRIIB				
K246T,P396H	CH2,CH3	↑1x	↑2.5x	
H268D,E318D	CH2	↑1.5x	↑5x	
K288N, A330S,P366L	CH2,CH3	↑5x	↑3x	2.34; 1.66; 2.54
I377F	CH3	↑1.5x	↑0.5x	
P244H,L358M,V379M,N384K,V397M	CH2,CH3	↑1.75x	↑1.5x	
P217S,A378V,S408R	Bisagra, CH₃	↑2x	↑4.5x	
P247L,I253N,K334N	CH2	↑3x	↑2.5x	
P247L	CH2	↑0.5x	↑4x	0.91; 0.94
F372Y	CH3	↑0.75x	↑5.5x	0.88; 0.59
K326E	CH2	↑2x	↑3.5x	1.63; 2
K246I, K334N	CH2	↑0.5x	↑4x	0.66; 0.6
K320E,K326E	CH2	↑1x	↑1x	
H224L	Bisagra	↑0.5x	↑5x	0.55; 0.53
S375C,P396L	CH3	↑1.5x	↑4.5x	
Unión disminuida a FcγRIIIA y FcγRIIB				
D342E,K327N,I378S	CH2,CH3	↑0.5x	NIC	
K288N, K325N	CH2	↑1x	NIC	
F275Y	CH2	↑3x	NIC	0.64
P247L,N421K	CH2,CH3	↑3x	NIC	2.0
S296N,W381R	CH2,CH3	↑2x	NIC	
D260E,S354F,A431D,L441I	CH2,CH3	↑3x	NIC	0.62
R256Q,K326E	CH2	↑2x	NIC	0.79
K218F,G281D,G385R	H,CH2,CH3	↑3.5x	NIC	0.67
L398V	CH3	↑1.5x	NIC	

ES 2 579 602 T3

Unión aumentada a F₇R11A y F₇R11B				
P247L,A330T,S440G	CH2,CH3	↑0.75x	↓0.25x	
V284A,F372L	CH2,CH3	1x	N/C	
T335N,P387S,H436Q	CH2,CH3	↑1.25x	N/C	
P247L,A431Y,S442F	CH2,CH3	1x	N/C	
Unión aumentada a F₇R11A y F₇R11B				
P343S,P353L,S375I,S383N	CH3	↑0.5x	↑6x	
T384M,V397M	CH3	↑0.5x	↑3x	
E216D,E345K,S375I	H, CH2,CH3	↑0.5x	↑4x	
K334N,	CH2	↑0.5x	↑2x	
K288N,A330S,P396L	CH2,CH3	↑0.5x	↑9x	
P247L,E389G	CH2,CH3	↑1.5x	↑9x	
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M	H, CH2,CH3	↑1x	↑7x	
G316D,A378V,C399E	CH2,CH3	↑1.5x	↑14x	2.24
N315I,V379M,T394M	CH2,CH3	↑1x	↑8x	1.37
K290T,G371D,	CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
P247L,L398Q	CH2,CH3	↑1.25x	↑10x	
K326Q,K334E,T360N,T366S	CH2,CH3	↑1.5x	↑6x	
S400P	CH3	↑1x	↑6x	
P247L,I377F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
A378V,N390I,V422I	CH3	↑0.5x	↑5x	
K326E,G385E	CH2,CH3	↑0.5x	↑15x	
V282E,V369I,L406F	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
V397M,T411A,S415N	CH3	↑0.25x	↑6x	
T223I,T256S,L406F	H, CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
S298N,S407R	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
K246R,S298N,I277F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
S407I	CH3	↑0.5x	↑4x	
F372Y	CH3	↑0.5x	↑4x	
I235P,V382M,S304G,V305I,V323I	CH2,CH3	↑2x	↑2x	
P247L,W313R,E389C	CH2,CH3	↑1.5x	↑1x	
D221Y,M252I,A330G,A339T,T358N,V422I,H433L	H, CH2,CH3	↑2.5x	↑6x	
E258D,N384K	CH2,CH3	↑1.25x	↑4x	
F241L,E258G	CH2	↑2x	↑2.5x	-0.08
K370N,S440N	CH2	↑1x	↑3.5x	
K317N,F423-eliminado	CH2,CH3	↑2.5x	↑7x	0.18
F243I,V379L,G420V	CH2,CH3	↑2.5x	↑3.5x	1.35
P227S,K290E	H, CH2	↑1x	↑0.5x	
A231V,Q386H,V413M	CH2,CH3	↑1.5x	↑6x	

ES 2 579 602 T3

Unión aumentada a FcγRIIIA y FcγRIIB				
T215P,C274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑4x	
Unión aumentada a FcγRIIB pero no a FcγRIIIA				
K334E,E380D	CH2,CH3	N/C	↑4.5x	
T366N	CH3	N/C	↑5x	
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T	CH2,CH3	N/C	↑3x	
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V	H, CH2,CH3	↓0.25x	↑10x	
Unión disminuida a FcγRIIIA y FcγRIIB				
R301H,K340E,D399E	CH2,CH3	↓0.60x	↓0.25x	
K414N	CH3	↓0.25x	N/B	
P201S,P363Q	CH2,CH3	↓0.60x	↓0.25x	
V240I,V281M	CH2	↓0.25x	↓0.25x	
P232S,S304G	CH2	N/B	N/B	
E269K,K290N,Q311R,H433Y	CH2,CH3	N/B	N/B	
M352L	CH3	N/B	N/B	
E216D,K334R,S375I	H, CH2,CH3	N/B	N/B	
P247L,L406F	CH2,CH3	N/B	N/B	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	N/B	N/B	
T225S	CH2	↓0.25x	↓0.50x	
D399E,M428L	CH3	↓0.60x	↓0.50x	
K246I,Q362H,K370E	CH2,CH3	N/B	↓0.50x	
K334E,E380D,G446V	CH2,CH3	N/B	N/B	
I377N	CH3	↓0.60x	N/B	
V309I,V309F,M428L	CH2,CH3	N/B	N/B	
L251F,F372L	CH2,CH3	N/B	N/B	
K246E,V284M,V308A	CH2,CH3	N/B	N/B	
D399E,G402D	CH3	N/B	N/B	
D399E,M428L	CH3	N/B	N/B	
Reducción FcγRIIB/selección FcγRIIIA: genoteca Fc virgen				
E293V,Q295E,A327T	CH2	↑0.4x	↓0 N/B	4.29
Y319F,P352L,P396L	CH2,CH3	↑3.4x	↑2x	1.09
K392T,P396L	CH3	↑4.5x	↑2.5x	3.07
K248M	CH2	↑0.4x	↓0 N/B	4.03
H268N,P396L	CH2,CH3	↑2.2x	↑4.5x	2.24

ES 2 579 602 T3

Solución competencia 40X F_{cy}R11B-G2:genoteca P396L				
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D		↑3.6x	↑0.1x	3.17
Tamiz equilibrio: 0.8 μM monómero F_{cy}R11A-:genoteca P396L				
K200T, N390I, P396L	CH2, CH3	↑2.8x	↑5.1x	1.93
K326I, P396L	CH2, CH3	↑2.9x	↑5.9x	1.16
H268D, P396L	CH2, CH3	↑3.8x	↑13.7x	2.15
K210M, P396L	CH1, CH3	↑1.9x	↑4.6x	2.02
L358P, P396L	CH3	↑1.0x	↑4.2x	1.58
K288R, T307A, K344E, P396L	CH2, CH3	↑4.1x	↑2.3x	3.3
V273I, K326E, L326I, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑10.8x	0.78
K326I, S408N, P396L	CH2, CH3	↑4x	↑9.3x	1.65
K334N, P396L	CH2, CH3	↑3.1x	↑3x	2.43
V379M, P396L	CH3	↑1.9x	↑5.6x	2.01
P227S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑4x	2.01
P217S, P396L	H, CH3	↑1.6x	↑4.5x	2.04
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	↑2x	↑4.2x	2.06
Tamiz cinético: 0.8 μM, 1' con 8 μM F_{cy}R11A frío:genoteca P396L				
término es M, P396L				
Q419H, P396L	CH3	↑1.9x	↑7.2x	3.09
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑0.9x	2.24
L242F, P396L	CH3	↑2x	↑5.6x	2.47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4.1x	2.4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	↑1.6x	↑5.4x	3.59
R255L, P396L	CH2, CH3	↑1.8x	↑6x	2.79
V240A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑4.2x	2.35
T259S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑5.8x	1.80
P247S, P396L	CH2, CH3	↑1.2x	↑4.2x	2.10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2, CH3	↑1.3x	↑5.7x	1.55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2, CH3	↑2.7x	↑9.7x	1.86
L410H, P396L	CH3	↑1.7x	↑4.5x	2.00
Q419L, P396L	CH3	↑2.2x	↑5.1x	1.70
V427A, P396L	CH3	↑1.9x	↑4.7x	1.67
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2, CH3	↑2x	↑7x	1.54
E258D, P396L	CH2, CH3	↑1.9x	↑4.9x	1.54
N384K, P396L	CH3	↑2.2x	↑5.2x	1.49
V323I, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑3.2x	1.29
K248N, Q419R, P396L	CH2, CH3	↑1.1x	↑4.8x	1.10
P217A, I359A, P396L	H, CH2, CH3	↑1.5x	↑4.8x	1.17

ES 2 579 602 T3

Terminación sintética: 0.8 µM, 1' con 8 µM FcγRIIIA frío genoteca P396L				
P214H, P396L	CH2,CH3	↑2.6x	↑4x	1.10
V215I, K290Y, P396L	H,CH2,CH3	↑2.2x	↑4.6x	1.74
F275L, Q362H, N364K, P396L	CH2,CH3	↑2.2x	↑3.7x	1.51
V315L, P396L	CH2,CH3	↑1.1x	↑5.5x	1.50
S410F, P396L	CH3	↑1.5x	↑4.7x	1.19
V313I, P396L	CH3	↑1.1x	↑4x	1.01
FcγRIIIB Reducción FcγRIIIA 158V selección fase sólida: genoteca virgen				
A330V, H433Q, V427M	CH2,CH3	NT	NT	NT
V253Q, E272D, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
N276Y, T392N, W417R	CH2,CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R	CH2,CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R	CH2,CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N	CH2	NT	NT	NT
V253Q, E272D	CH2	NT	NT	NT
R292G	CH2	NT	NT	NT
S298N	CH2	NT	NT	NT
E299G, P247G, L306P	CH2	NT	NT	NT
D270E	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T	CH2	NT	NT	NT
E233G	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L	CH2,CH3	NT	NT	NT
FcγRIIIB Reducción FcγRIIIA 158F selección fase sólida: genoteca virgen				
158F por FACS máximo 0.2%				
V284M, S298N, K334E, R355W, R416T	CH2,CH3	NT	NT	
FcγRIIIB Reducción FcγRIIIA 131H selección fase sólida: genoteca virgen				
R292P, V306I	CH2,CH2	NT	NT	
D270E, G316D, R416G	CH2,CH3	NT	NT	
V284M, R292L, K370N	CH2,CH3	NT	NT	
R292P, V306I, F243L	CH2	NT	NT	

Mutaciones	Dominio	Unión FcγRIIIA (ELISA)	a Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
Tamiz por FACS de la genoteca pYD-CH1 con el tetrámero 3A				
Q347H; A339V	CH3	↑0.5x	NT	
S415I; L251F	CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.82
K392R	CH3	N/C	NT	
				0.65
D399E; R292L; V185M	CH1,CH2,CH3	N/C	↑0.5x	0.9
K290E; L142P	CH1, CH2	N/C	NT	
R301C; M252L; S192T	CH1,CH2	↓.5x	NT	
P291S; K288E; H268L; A141V	CH1,CH2	↓.5x	NT	
N315I	CH2	N/C	↑.75x	
S132I	CH1	N/C	NT	

ES 2 579 602 T3

S383N; N384K; T256N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M	ALL	↑0.5x	NT	
S408I; V215I; V125L	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.62
P396L	CH3	↑1x	↑1x	0.55
G385E; P247H:	CH2, CH3	↑1x	↑.75x	0.44
P396H	CH3	↑1x	↑1x	0.58
A162V	CH1	N/C	NT	
V348M; K334N; F275I; Y202M; K147T	CH1,CH2,CH3	↑0.5x	↑.75x	0.33
H310Y; T289A; G337E	CH2	↑.5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D	CH1,CH2,CH3	N/C	N/C	0.29
K409R;S166N	CH1, CH3	N/C	NT	
Mutantes de ditio dirigido in vitro				
R292L	CH2		NT	NT 0.82
T359N	CH3		NT	NT 1.06
T366S	CH3		NT	NT 0.93
E333A, K334A	CH2		NT	NT 1.41
R292L, K334E	CH2		NT	NT 1.41; 1.64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3		NT	NT 0.89; 1.15
V379L	CH3		NT	NT 0.83
K288N	CH2		NT	NT 0.78
A330S	CH2		NT	NT 0.52
F243L	CH2		NT	NT 0.38
E318K	CH2		NT	NT 0.86
K288N, A330S	CH2		NT	NT 0.08
R255L, E318K	CH2		NT	NT 0.82
F243L, E318K	CH2		NT	NT 0.07

Mutantes en la mini genoteca 4-4-20 aumento de la unión a FcγRIIIA, disminución o ningún cambio en la unión a FcγRIIB N/C significa sin cambio; N/B significa no-unión; NT significa sin probar				
V379M	CH3	↑2x	N/C	1.47
S219Y	Bisagra	↑1x	↓ N/B	1.28
V282M	CH2	↑1x	↓ N/B	1.25; 1
F275I, K334N, V348M	CH2	↑0.5x	N/C	
D401V	CH3	↑0.5x	N/C	
V279L, P395S	CH2	↑1x	N/C	
K222N	bisagra	↑1x	↓ N/B	1.33; 0.63
K246T, Y319F	CH2	↑1x	N/C	
F243I, V379L	CH2, CH3	↑1.5x	↓ N/B	1.86; 1.35
F243L, R255L, E318K	CH2	↑1x	↓ N/B	1.81; 1.45
K334I	CH2	↑1x	N/C	2.1; 1.97
K334E, T359N, T366S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	1.49; 1.45
K288M, K334E	CH2	↑3x	↓ N/B	1.61; 1.69
K334E, E380D	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
T256S, V305I, K334E, N390S	CH2, CH3	↑1.5x	N/C	
K334E	CH2	↑2.5x	N/C	1.75; 2.18
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L	CH2, CH3	↑0.5x	N/C	
E233D, K334E	CH2	↑1.5x	N/C	0.94; 1.02
K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	↑1x	N/C	
Aumento de la unión a FcγRIIIA y FcγRIIB				
K246T, P396H	CH2, CH3	↑1x	↑2.5x	
H268D, E318D	CH2	↑1.5x	↑5x	
K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	↑5x	↑3x	2.34; 1.66; 2.54
I377F	CH3	↑1.5x	↑0.5x	
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2, CH3	↑1.75x	↑1.5x	
P217S, A378V, S408R	Bisagra, CH3	↑2x	↑4.5x	

ES 2 579 602 T3

P247L, I253N, K334N	CH2	13x	12.5x	
P247L	CH2	10.5x	14x	0.91; 0.84
F372Y	CH3	10.75x	15.5x	0.88; 0.59
K326E	CH2	12x	13.5x	1.63; 2
K246I, K334N	CH2	10.5x	14x	0.66; 0.6
K320E, K326E	CH2	11x	11x	
H224L	Bisagra	10.5x	15x	0.55; 0.53
S375C, P396L	CH3	11.5x	14.5x	
D312E, K327N, I378S	CH2, CH3	10.5x	N/C	
K288N, K328N	CH2	11x	N/C	
F275Y	CH2	13x	N/C	0.64
P247L, N421K	CH2, CH3	13x	N/C	2.0
S298N, W381R	CH2, CH3	12x	N/C	
D280E, S354F, A431D, L441I	CH2, CH3	13x	N/C	0.62
R255Q, K326E	CH2	12x	N/C	0.79
K218F, G281D, G385R	H, CH2, CH3	13.5x	N/C	0.67
L398V	CH3	11.5x	N/C	
P247L, A330T, S440G	CH2, CH3	10.75x	10.25x	
V284A, F372L	CH2, CH3	1x	N/C	
T335N, P387S, H435Q	CH2, CH3	1.25x	N/C	
P247L, A431V, S442F	CH2, CH3	1x	N/C	

ES 2 579 602 T3

Aumento de la unión a FcyRIIIA y FcyRIIB				
P343S,P353L,S375I,S383N	CH3	↑0.5x	↑6x	
T394M,V397M	CH3	↑0.5x	↑3x	
E216D,E345K,S375I	H, CH2,CH3	↑0.5x	↑4x	
K334N,	CH2	↑0.5x	↑2x	
K288N,A330S,P396L	CH2,CH3	↑0.5x	↑9x	
P247L,E389G	CH2,CH3	↑1.5x	↑9x	
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M	H, CH2,CH3	↑1x	↑7x	
G316D,A378V,D399E	CH2,CH3	↑1.5x	↑14x	2.24
N315I,V379M,T394M	CH2,CH3	↑1x	↑9x	1.37
K290T,G371D,	CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
P247L,L398Q	CH2,CH3	↑1.25x	↑10x	
K326Q,K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑1.5x	↑5x	
S400P	CH3	↑1x	↑6x	
P247L,I377F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
A378V,N390I,V422I	CH3	↑0.5x	↑5x	
K326E,G385E	CH2,CH3	↑0.5x	↑15x	
V282E,V369I,L406F	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
V397M,T411A,S415N	CH3	↑0.25x	↑5x	
T223I,T256S,L406F	H, CH2,CH3	↑0.25x	↑6x	
S298N,S407R	CH2,CH3	↑0.5x	↑7x	
K246R,S298N,I377F	CH2,CH3	↑1x	↑5x	
S407I	CH3	↑0.5x	↑4x	
F372Y	CH3	↑0.5x	↑4x	
L235P,V382M,S304G,V305I,V323I	CH2,CH3	↑2x	↑2x	
P247L,W313R,E388G	CH2,CH3	↑1.5x	↑1x	
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L	H, CH2,CH3	↑2.5x	↑6x	
E258D,N384K	CH2,CH3	↑1.25x	↑4x	
F241L,E258G	CH2	↑2x	↑2.5x	-0.08
K370N,S440N	CH3	↑1x	↑3.5x	
K317N,F423-eliminado	CH2,CH3	↑2.5x	↑7x	0.18
F243I,V379L,G420V	CH2,CH3	↑2.5x	↑3.5x	1.35
P227S,K290E	H, CH2	↑1x	↑0.5x	
A231V,Q386H,V412M	CH2,CH3	↑1.5x	↑6x	
T215P,IC274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑4x	

ES 2 579 602 T3

Aumento de la unión a FcγRIIB pero no a FcγRIIA				
K334E,E380D	CH2,CH3	N/C	↑4.5x	
T366N	CH3	N/C	↑5x	
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T	CH2,CH3	N/C	↑3x	
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V	H, CH2,CH3		↓0.25x	↑10x

Disminución de la unión a FcγRIIA y FcγRIIB				
R301H,K340E,D399E	CH2,CH3		↓ 0.50x	↓ 0.25x
K414N	CH3		↓ 0.25x	N/B
P291S,P353Q	CH2,CH3		↓ 0.50x	↓0.25x
V240I, V281M	CH2		↓0.25x	↓0.25x
P232S, S304G	CH2		N/B	N/B
E269K,K290N,Q311R,H433Y	CH2,CH3		N/B	N/B
M352L	CH3		N/B	N/B
E216D,K334R,S375I	H, CH2,CH3		N/B	N/B
P247L,L406F	CH2,CH3		N/B	N/B
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3		N/B	N/B
T225S	CH2		↓ 0.25x	↓ 0.50x
D399E,M428L	CH3		↓ 0.50x	↓ 0.50x
K246I,Q362H,K370E	CH2,CH3		N/B	↓ 0.50x
K334E,E380D,G446V	CH2,CH3		N/B	N/B
I377N	CH3		↓ 0.50x	N/B
V303I,V369F,M428L	CH2,CH3		N/B	N/B
L251F,F372L	CH2,CH3		N/B	N/B
K246E,V284M,V308A	CH2,CH3		N/B	N/B
D399E,G402D	CH3		N/B	N/B
D399E,M428L	CH3		N/B	N/B
Reducción de FcγRIIB/selección de FcγRIIA: genoteca de Fc virgen.				
E293V,Q295E,A327T	CH2		↑0.4x	↓ o N/B 4.29
Y319F,P352L,P396L	CH2,CH3		↑3.4x	↑2x 1.09
K392T,P396L	CH3		↑4.5x	↑2.5x 3.07
K248M	CH2		↑0.4x	↓ o N/B 4.03
H268N,P396L	CH2,CH3		↑2.2x	↑4.5x 2.24

ES 2 579 602 T3

Solución de competencia 40X de FcγRIIB-G2:Genoteca P396L					
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D			13.6x	10.1x	3.17
Tamiz de equilibrio: 0.8 μM de monómero FcγRIIIA :genoteca P396L					
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	12.8x	16.1x		1.93
K326I, P396L	CH2, CH3	12.9x	15.9x		1.16
H268D, P396L	CH2, CH3	13.8x	113.7x		2.15
K210M, P396L	CH1, CH3	11.9x	14.6x		2.02
L358P, P396L	CH3	11.9x	14.2x		1.58
K288R, T307A, K344E, P396L	CH2, CH3	14.1x	12.3x		3.3
V273I, K326E, L328I, P396L	CH2, CH3	11.3x	110.8x		0.78
K326I, S408N, P396L	CH2, CH3	14x	19.3x		1.65
K334N, P396L	CH2, CH3	13.1x	13x		2.43
V379M, P396L	CH3	11.9x	15.6x		2.01
P227S, P396L	CH2, CH3	11.5x	14x		2.01
P217S, P396L	H, CH3	11.6x	14.5x		2.04
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	12x	14.2x		2.06

Tamiz cinético: 0.8 μM, 1' con 8 μM de FcγRIIIA frío: genoteca P396L					
término es M, P396L	CH3	11.9x	17.2x		3.09
Q419H, P396L	CH3	12x	16.9x		2.24
K370E, P396L	CH3	12x	16.6x		2.47
L242F, P396L	CH2, CH3	12.5x	14.1x		2.4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	11.6x	15.4x		3.59
R255L, P396L	CH2, CH3	11.8x	16x		2.79
V240A, P396L	CH2, CH3	11.3x	14.2x		2.35
T250S, P396L	CH2, CH3	11.5x	16.8x		1.60
P247S, P396L	CH2, CH3	11.2x	14.2x		2.10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2, CH3	11.3x	16.7x		1.55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2, CH3	12.7x	18.7x		1.88
L410H, P396L	CH3	11.7x	14.5x		2.00
Q419L, P396L	CH3	12.2x	16.1x		1.70
V427A, P396L	CH3	11.9x	14.7x		1.67

ES 2 579 602 T3

P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2,CH3	†2x	†7x	1.54
E258D, P396L	CH2,CH3	†1.9x	†4.9x	1.54
N384K, P396L	CH3	†2.2x	†5.2x	1.49
V323I, P396L	CH2,CH3	†1.1x	†8.2x	1.29
K246N, Q419R, P396L	CH2,CH3	†1.1x	†4.8x	1.10
P217A, T359A, P396L	H,CH2,CH3	†1.5x	†4.8x	1.17
P244H, P396L	CH2,CH3	†2.5x	†4x	1.40
V215I, K290V, P396L	H,CH2,CH3	†2.2x	†4.6x	1.74
F275L, Q382H, N384K, P396L	CH2,CH3	†2.2x	†3.7x	1.51
V305L, P396L	CH2,CH3	†1.3x	†5.5x	1.50
S400F, P396L	CH3	†1.5x	†4.7x	1.19
V303I, P396L	CH3	†1.1x	†4x	1.01
selección en fase sólida de FcγRIIIA 158V con reducción de FcγRIIB: genoteca virgen				
A330V, H433Q, V427M	CH2,CH3	NT	NT	NT
V263Q, E272D, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
N276Y, T393N, W417R	CH2,CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R	CH2,CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R	CH2,CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N	CH2	NT	NT	NT
V263Q, E272D	CH2	NT	NT	NT
R292G	CH2	NT	NT	NT
S298N	CH2	NT	NT	NT
E233G, P247S, L308P	CH2	NT	NT	NT
D270E	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T	CH2	NT	NT	NT
E233G	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L	CH2,CH3	NT	NT	NT

selección en fase sólida de FcγRIIIA 158V con reducción de FcγRIIB: genoteca virgen				
158F por FACS máximo 0.2 %				
V284M, S298N, K334E, R355W R418T	CH2,CH3	NT	NT	
selección en fase sólida de FcγRIIA 131H con reducción de FcγRIIB: genoteca virgen				
R292P, V305I	CH2,CH2	NT	NT	
D270E, G318D, R418G	CH2,CH3	NT	NT	
V284M, R292L, K370N	CH2,CH3	NT	NT	
R292P, V305I, F243L	CH2	NT	NT	

En realizaciones preferidas, la invención proporciona moléculas de inmunoglobulina modificadas (por ejemplo, anticuerpos) con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, donde una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la molécula por FcγRIIIA y preferiblemente también por FcγRIIA. Dichas inmunoglobulinas incluyen moléculas IgG que contienen naturalmente regiones de unión FcγR (por ejemplo, región de unión a FcγRIIIA y FcγRIIB), o derivados de la inmunoglobulina que se manipularon genéticamente para contener una región de unión FcγR (por ejemplo, región de unión FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Las inmunoglobulinas modificadas de la invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferentemente, inmunoespecíficamente, es decir, compete por la unión no específica que se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar la unión específica antígeno-anticuerpo, un antígeno y contiene una región de unión a FcγR (por ejemplo, una región de unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Tales anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, monoclonales, bi-específicos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs enlazado a disulfuro, y fragmentos que contienen ya sea un dominio VL o VH o incluso una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, manipulado genéticamente para contener o fusionarse a una región de unión FcγR.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden porciones de una región Fc. Como se utiliza en la presente el término "porción de una región Fc" se refiere a fragmentos de la región Fc, preferentemente una porción con actividad efectora y/o actividad de unión a FcγR (o una región comparable de un mutante que carece tal actividad). El fragmento de una región Fc puede estar en el intervalo de 5 aminoácidos a la región Fc entera menos un aminoácido. La porción de una región Fc puede carecer de hasta 10, hasta 20, hasta 30 aminoácidos del N-terminal o C-terminal.

Las moléculas IgG de la invención son preferiblemente de la subclase de IgG1 de IgGs, pero también pueden ser cualesquier otras subclases de IgG de animales dados. Por ejemplo, en los seres humanos, la clase IgG incluye IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4; y la IgG de ratón incluye IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

Las inmunoglobulinas (y otros polipéptidos usados en la presente descripción) pueden ser de cualquier origen animal que incluyen aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humano, roedor (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de indias, camello, caballo o pollo. Como se utiliza en la presente, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de genotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más abajo y, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,939,598 por Kucherlapati y otros.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para epítopos diferentes de un polipéptido o pueden ser específicos para epítopos heterólogos, tales como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, y otros, J. Immunol., 147:60-69, 1991; las patentes de los Estados Unidos núms. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny y otros, J. Immunol., 148:1547-1553, 1992.

Anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque tales moléculas normalmente sólo se unen a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos se abarcan en la presente invención. Ejemplos de BsAbs incluyen sin limitarse a aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula citotóxica.

- Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y otros, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas, estos
- 5 hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO 93/08829, y en Traunecker y otros, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).
- 10 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables del anticuerpo con especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera
- 15 región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores separados de expresiones, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones mientras que las relaciones
- 20 desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión, cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no son de particular importancia.
- En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de un híbrido de cadena pesada de la inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo, y un híbrido del par cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de la
- 25 inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y otros, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986). De acuerdo con otro enfoque se descrito en WO96/27011, un par de moléculas de anticuerpo pueden ser manipuladas genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o
- 30 más cadenas de aminoácidos laterales pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). "Cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de las cadenas de aminoácidos laterales grandes con otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo de aumento del rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.
- 35 Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a las células no deseadas (patente de Estados Unidos núm. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar usando cualquiera de los métodos de reticulación conveniente.
- 40 Agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.
- Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, anticuerpos trispecíficos se pueden preparar. Véase, por ejemplo, Tutt y otros *J. Immunol.* 147: 60 (1991), la cual se incorpora en la presente como referencia.
- 50 Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que de cualquier otra forma se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo tal que la unión covalente no impide al anticuerpo unirse al antígeno y/o generar una respuesta anti-idiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se pueden llevar a
- 55 cabo por técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Para algunos usos, que incluyen el uso in vivo de anticuerpos en humanos y ensayos de detección in vitro, puede ser preferible usar anticuerpos humanos, quiméricos, o humanizados. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante derivada de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica Véase por ejemplo, Morrison, Science, 229:1202, 1985; Oi y otros, BioTechniques, 4:214 1986; Gillies y otros, J. Immunol. Methods, 125:191-202, 1989; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene uno o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y regiones marco y dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos marco en las regiones marco humanas serán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por el modelado de las interacciones de las CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencia para identificar los residuos marco inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen y otros, la patente de los Estados Unidos núm. 5,585,089; Riechmann y otros, Nature, 332:323, 1988. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239,400; publicación del PCT WO 91/09967; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), recubrimiento o revestimiento (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498, 1991; Studnicka y otros, Protein Engineering, 7(6):805-814, 1994; Roguska y otros, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973, 1994), e intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos núm. 5,565,332). Los anticuerpos humanizados pueden generarse con el uso de cualquiera de los métodos descritos en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,693,762 (Protein Design Labs), 5,693,761, (Protein Design Labs) 5,585,089 (Protein Design Labs), 6,180,370 (Protein Design Labs), y publicación de Estados Unidos núms. 20040049014, 200300229208, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de los pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden hacer por una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase las patentes de los Estados Unidos núms. 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones del PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos se pueden producir además usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, Véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol., 13:65-93, 1995. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos humanos monoclonales y los protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea núm. 0 598 877; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; y 5,939,598. Adicionalmente, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San Jose, CA) se pueden contratar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la que se describió anteriormente.

Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar usando una técnica referida como "selección guiada." En este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers y otros, Bio/technology, 12:899-903, 1988).

La invención abarca modificar anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc, por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización, la invención se relaciona con modificar los anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc, por modificación de al menos un residuo de aminoácido, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y disminuye además la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Los anticuerpos terapéuticos manipulados genéticamente pueden tener además una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., determinado por ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo monoclonal humanizado específico por el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, anticuerpo humanizado Ab4D5 como se describe en Carter y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9) por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos

un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, los anticuerpos monoclonales humanizados manipulados genéticamente específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora mejorada determinada por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción.

En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano y ratón, 2H7 por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 puede además disminuir más aun la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 manipulado genéticamente, 2H7 puede tener además una función efectora mejorada determinado por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción.

En algunas realizaciones, la invención abarca modificar un anticuerpo (o quimérico, humanizado u otras versiones manipuladas genéticamente de estos), que comprende el dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.4.3, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tiene los números de acceso de la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente (depositados en la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011, todos los cuales se incorporan aquí como referencia). En una realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo humanizado que comprende los dominios variables de cadena pesada y/o de cadena ligera de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. En otra realización específica, la invención abarca modificar un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.:2 o sec. con núm. de ident.:3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.: 6, sec. con núm. de ident.:7. o sec. con núm. de ident.: 8. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:13 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:14. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:8. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:9 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:10.

En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB que incluye pero sin limitarse a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/403,266 presentada el 12 de agosto de 2002, la solicitud de los Estados Unidos núm. 10/643,857 presentada el 14 de agosto de 2003 (publicada como US 2004-0185045), la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/562,804 presentada el 16 de abril de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582,044 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582,045 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/636,663 presentada el 15 de diciembre de 2004 y la solicitud de los Estados Unidos núm. de serie 10/524,134 presentada el 11 de febrero de 2005 (publicada como US 2005 0215767) por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumentan la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que incluye pero sin limitarse a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/569,882 presentada el 10 de mayo de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582, 043 presentada el 21 de junio de 2004 y la solicitud de los Estados Unidos núm. 11/126,978, presentada el 10 de mayo de 2005 (publicada como US 2006 0013810) por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Los ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB, que se pueden humanizar o no, que pueden manipularse genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-4592, anticuerpo monoclonal 1D5 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5958, anticuerpo monoclonal 1F2 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5959, anticuerpo monoclonal 2D11 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5960, anticuerpo monoclonal 2E1 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5961, 8B5.3.4 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-7610 y anticuerpo monoclonal 2H9 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5962 (depositados en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011) que se incorporan aquí como referencia. En otra realización específica, la

modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB puede además disminuir más la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente puede tener además una función efectora mejorada determinada por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción.

- 5 En una realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB de acuerdo con los métodos de la presente invención que comprenden una o más regiones complementariamente determinantes (CDR), preferentemente todas las 6 CDR, del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, o 8B5.3.4 con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, y PTA-7610, respectivamente (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). En una realización específica, un anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención comprende una o más regiones complementariamente determinantes (CDR), preferentemente todas las 6 CDR, del anticuerpo producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, and PTA-5959, respectivamente (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). En otra realización, un anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, o 8B5.3.4 con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, y PTA-7610, respectivamente y/o compete con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, o 8B5.3.4 con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, y PTA-7610, respectivamente determinado, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo adecuado, y se une además a FcγRIIB con una mayor afinidad que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA. En otra realización, un anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tiene números de acceso a la ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, y/o compete con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tiene números de acceso a la ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, determinado, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo adecuado, y se une además a FcγRIIB, por medio de su región variable, con una mayor afinidad que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA.

La presente invención abarca además manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. La presente invención abarca adicionalmente la manipulación genética del anticuerpo anti-FcγRIIBs que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por cualquier método conocido por aquel con experiencia en la técnica, que incluyen las búsquedas BLAST de proteínas.

La presente invención abarca además la manipulación genética de uno o más anticuerpo anti-FcγRIIBs que comprende uno o más dominios variables codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de uno o más dominios variables de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, bajo condiciones rigurosas. En una realización preferida, la invención abarca manipular genéticamente uno o más anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden un dominio variable de cadena ligera y/o variable de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos del dominio variable de cadena ligera y/o variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, bajo condiciones rigurosas. En otra realización preferida, la invención proporciona manipular genéticamente anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero sin limitarse a, hibridación con ADN unido a filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0.2 X SSC/0.1 % de SDS a

aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como la hibridación a ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0.1 X SSC/0.2 % de SDS a aproximadamente 60 °C, o cualquier otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y otros, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

En una realización preferida, los anticuerpos manipulados genéticamente de la invención son humanizados por cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente y/o comprenden las regiones CDR de un anticuerpo FcγRIIB específico humanizado o anticuerpo específico CD20 humanizado, en donde dichos CDRs se derivan a partir de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB o CD20, respectivamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en la presente comprenden alteraciones, que incluyen pero sin limitarse a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, es decir, regiones marco del dominio variable de cadena ligera y/o pesada humana que son necesarias para mantener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas realizaciones, las regiones marco de los anticuerpos humanizados descritos en la presente no necesariamente consisten de la secuencia de aminoácido precisa de la región marco de una región variable del anticuerpo humano de origen natural, pero contiene varias alteraciones, que incluyen pero sin limitarse a deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región variable del anticuerpo humanizado que es específico para el mismo objetivo que el anticuerpo FcγRIIB murino o específico a CD20. En las realizaciones más preferidas, se hacen un número mínimo de alteraciones a la región marco para evitar las introducciones a gran escala de residuos marco no humanos y para asegurar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado de la invención en los humanos. El anticuerpo monoclonal donador es preferentemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 (que tiene números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente) que se une a FcγRIIB, o el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo CD20, tal como rituximab o 2H7.

En una realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo de injerto de CDR que comprende un dominio de la región variable de la cadena pesada que comprende los residuos marco del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tiene números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo de injerto de CDR que comprende un dominio de la región variable de la cadena ligera que comprende los residuos marco del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2.

Preferentemente los anticuerpos FcγRIIB humanizados se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. Los anticuerpos anti- FcγRIIB humanizados de las combinaciones pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (sec. con núm. de ident.: 15 o sec. con núm. de ident.: 16) y/o CDR2 (sec. con núm. de ident.:17 o sec. con núm. de ident.:18) y/o CDR3 (sec. con núm. de ident.: 19 o sec. con núm. de ident.:20) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (sec. con núm. de ident.:21 o sec. con núm. de ident.:22) y/o una CDR2 (sec. con núm. de ident.:23, sec. con núm. de ident.:24, sec. con núm. de ident.:25, o sec. con núm. de ident.:26) y/o CDR3 (sec. con núm. de ident.:27 o sec. con núm. de ident.:28).

En una realización específica, la invención abarca la manipulación genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado con el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:2, o sec. con núm. de ident.:3 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:4, sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:6; sec. con núm. de ident.:7 o sec. con núm. de ident.:8.

En una realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado, en donde la región VH del anticuerpo FcγRIIB consiste de los segmentos FR a partir del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda y otros, 1998, J. Exp. Med. 188:2151062) y JH6 (Ravetch y otros, 1981, Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR de un de 2B6 VH, que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.:17, o sec. con núm. de ident.:19. En una realización, el 2B6 VH tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:3, o sec. con núm. de ident.:29. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado comprende además una región VL, que consiste de los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske y otros, 1992, Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) y JK4 (Hieter y otros, 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más regiones CDR

de un 2B6VL, que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:21, sec. con núm. de ident.:23, sec. con núm. de ident.:24, sec. con núm. de ident.:25, y sec. con núm. de ident.:27. En una realización, el 2B6 VL tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:4, sec. con núm. de ident.:5, sec. con núm. de ident.:6; sec. con núm. de ident.:7, sec. con núm. de ident.:8, o sec. con núm. de ident.:30, y opcionalmente en combinación con una de las 2B6 VH referenciadas anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene una cadena VH y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VH-3):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGVIDPSDTPNYN
KKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYSGMDYWGQGTITVTVSS

Sec. con núm. de ident.:3

- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene una cadena VL y/o dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VL-5):

EIVLTQSPDFQSVPKPEKVTFTCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKEVSEISISGVPSR
FSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFYFGGGTKVEIK(sec. con núm. de ident.:8)

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene una cadena VH y/o dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VH-3):

- 15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGVIDPSDTPNYN
KKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYSGMDYWGQGTITVTVSS

(sec. con núm. de ident.:3), y una cadena VL y/o dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VL-5):

EIVLTQSPDFQSVPKPEKVTFTCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKEVSEISISGVPSR
FSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFYFGGGTKVEIK(sec. con núm. de ident.:8)

- 20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene un dominio VH y/o cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VH, véase Fig. 2):

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCEASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRNKAKNHATY
YAESVIGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCGALGLDYWGQGTTLTVSS (sec. con núm. de ident. NO:9).

- 25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene un dominio VL y/o cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VL, véase Fig. 1):

DIQMTQSPSSLLAALGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASLDLDSGVPKR
FSGSESGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYFSYPLTFGAGTKLELK(sec. con núm. de ident.:10)

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención tiene un dominio VH y/o cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VH):

- 30 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCEASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRNKAKNHATY
YAESVIGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCGALGLDYWGQGTTLTVSS

(sec. con núm. de ident.:9, véase Fig. 2), y un dominio VL y/o cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VL, véase Fig.1):

DIQMTQSPSSLLAALGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASLTLD SGVPKR

FSGSESGSDYSLTISSLESEDFADYYCLOQYFSYPLTFGAGTKLELK(sec. con núm. de ident.:10)

- 5 En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención es un anticuerpo 3H7 humanizado, en donde la región VH de FcγRIIB consiste de los segmentos FR a partir de un segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR del 3H7 VH, que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 37. En otra realización específica, el anticuerpo 3H7 humanizado comprende además una región VL, que consiste de los segmentos FR de un segmento VL de línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7VL, que tienen la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:7.
- 10 En particular, la invención abarca la manipulación genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB en donde el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo, dicho anticuerpo FcγRIIB comprende (o alternativamente, consiste en) secuencias de CDR de 2B6, 3H7, o 8B5.3.4 en cualquiera de las siguientes combinaciones: una VH CDR1 y una VL CDR1; una VH CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2 y una VL CDR1; VH CDR2 and VL CDR2; una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR3 and una VH CDR1; una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR3 y una VL CDR3; a VH1 CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR1; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR2, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, a VL CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, a VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR3, a VL CDR1, una VH CDR2, a VL CDR1, a VL CDR2, y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; o cualquier combinación de estas de las VH CDR y VL CDR descritas en la presente descripción.
- 30 En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico, y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la (véase Tablas 5 & 6) posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina (véase las tablas 5 & 6).
- 50 5.1.1 Polipéptido y conjugados de anticuerpo

Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprende regiones Fc variantes pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse químicamente (que incluyen tanto conjugaciones de manera covalente y no covalente) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o porción de este,, preferentemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al

menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión obligatoriamente no necesita ser directa, pero puede ocurrir a través de secuencias enlazadoras.

Más aun, las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden conjugarse con un agente terapéutico o una porción de fármaco que modifica una respuesta biológica dada.

5 Los agentes terapéuticos o porciones de fármacos no han de interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas (es decir, PE-40), o toxina de la difteria, ricina, gelonina y proteína antiviral de fitolaca. Una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, pero sin limitarse a, α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador tisular del plasminógeno (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I como se describe en la publicación del PCT núm. WO 97/33899), AIM II (Véase, publicación del PCT núm. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi y otros, J. Immunol., 6:1567-1574, 1994), y VEGI (publicación del PCT núm. WO 99/23105), un agente trombólito o un agente anti-angiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador particular de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), actor estimulante de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas, o ribonucleasas.

20 Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tal como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el comercio. Como se describió en Gentz y otros, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina se proporciona para una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero sin limitarse a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epitopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y otros, Cell, 37:767 1984) y la etiqueta "flag" (Knappik y otros, Biotechniques, 17(4):754-761, 1994).

30 Proteínas adicionales de fusión se pueden generar a través de las técnicas de transposición de gen, transposición de motivo, transposición de exón y/o transposición de codón (colectivamente referido como "transposición de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades superiores y tasas de disociación inferiores). Véase, generalmente, las patentes de Estados Unidos núms. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten y otros, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, y otros, 1999, J. Mol. Biol. 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, BioTechniques 24:308 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencias en su totalidad). Las moléculas de la invención que comprenden las regiones Fc variantes, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, se pueden alterar además sometiéndose a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos previos a la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención, puede estar recombinada con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

45 La presente invención abarca además moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes (es decir, anticuerpos, polipéptidos) conjugado con un agente de diagnóstico o agente terapéutico o cualquier otra molécula para los que la vida media en suero se desea aumentar y/o que se dirija a un subconjunto particular de las células. Las moléculas de la invención se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen determinado de tratamiento. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente al anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para el uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Tal diagnóstico y la detección se puede lograr mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a las sustancias detectables que incluyen, pero sin limitarse a, varias enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; complejos de grupo prostético tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina,

5 diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminescentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina, y aecuorina; material radiactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (213Bi), carbono (14C), cromo (51Cr), cobalto (17Co), flúor (18F), gadolinio (153Gd, 159Gd), galio (68Ga, 67Ga), germanio (68Ge), holmio (166Ho), indio (115In, 113In, 112In, 111In), yodo (131I, 125I, 123I, 121I), lantano (140La), lutecio (177Lu), manganeso (54Mn), molibdeno (99Mo), paladio (103Pd), fósforo (32P), praseodimio (142Pr), promecio (149Pm), renio (186Re, 188Re), rodio (105Rh), rutenio (97Ru), samario (153Sm), escandio (47Sc), selenio (75Se), estroncio (85Sr), azufre (35S), tecnecio (99Tc), talio (201Tl), estaño (113Sn, 117Sn), tritio (3H), xenon (133Xe), iterbio (169Yb, 175Yb), itrio (90Y), cinc (65Zn); metales emisores de positrones usando varias tomografías de emisión de positrones, y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

15 Las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden una región Fc variante pueden conjugarse a una porción terapéutica tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citotóxica), un agente terapéutico o un elemento radioactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos o homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y el platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

25 Además, una molécula de la invención se puede conjugar a porciones terapéuticas tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para los ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que se puede unir al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Las moléculas enlazadoras de ese tipo son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo y otros, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson y otros, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman y otros, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

35 Las técnicas para conjugar tales porciones terapéuticas con los conjugados son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y otros (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y otros (eds.), 1985, págs. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y otros (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe y otros, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982.

45 En una realización, donde la molécula de la invención es un anticuerpo que comprende una región Fc variante, que pueden administrarse con o sin una porción terapéutica conjugado a este, administrado sólo o en combinación con el(os) factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s) para su uso como un tratamiento terapéutico. Alternativamente, un anticuerpo de la invención se puede conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980. Los anticuerpos de la invención se pueden unir además a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno objetivo. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.2 Tamizaje de moléculas con regiones Fc variantes para la unión mejorada a FCyRIII y caracterización de estas

50 En realizaciones preferidas, el tamizaje e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcyR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcyRIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o más ensayos bioquímicos, preferentemente de un modo rápido. Uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-FcyR, es decir, la unión específica de una región Fc a una FcyR, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y diálisis de equilibrio. En algunas realizaciones, el tamizaje e

identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcγR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcγRIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o mas ensayos funcionales, preferentemente de un modo rápido. Los ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para la caracterización de una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR tales como las descritas en la presente en la Sección 5.2.7. Los ejemplos no limitativos de funciones de células efectoras que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención, incluyen pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpo, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, rosetas, unión a C1q, y citotoxicidad mediada por la célula dependiente de complemento. En algunas realizaciones, el tamizaje e identificación moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas a FcγR (por ejemplo, afinidad mejorada a FcγRIIIA) se realizan usando la tecnología de exposición en levadura como se describe en la presente en conjunto con uno o más ensayos bioquímicos en conjunto o en paralelo con uno o más ensayos funcionales, preferentemente de un modo rápido.

El término "unión específica" de una región Fc a un FcγR se refiere a una interacción de la región Fc y un FcγR particular que tiene una constante de afinidad de al menos aproximadamente 150 nM, en el caso del FcγRIIIA monomérico y al menos aproximadamente 60 nM en el caso del FcγRIIB dimérico determinado mediante el uso de, por ejemplo, un ELISA o ensayo de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, un BIAcore™). La constante de afinidad de una región Fc para FcγRIIIA monomérico puede ser 150 nM, 200 nM o 300nM. La constante de afinidad de una región Fc para FcγRIIB dimérico puede ser 60 nM, 80 nM, 90 nM, o 100 nM. FcγRIIB dimérico para su uso en los métodos de la invención se puede generar usando los métodos conocidos para una persona con experiencia en la técnica. Típicamente, la región extracelular de FcγRIIB se enlaza covalentemente a un polipéptido heterólogo que es capaz de la dimerización, de modo que la proteína de fusión resultante es un dímero, por ejemplo, véase, solicitud de los Estados Unidos núm. 60/439,709 presentada el 13 de enero, 2003 (Expediente judicial núm. 11183-005-888). Una interacción específica generalmente es estable bajo condiciones fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, las condiciones que se producen en un individuo vivo tales como un humano u otro vertebrado o invertebrado, así como las condiciones que se producen en un cultivo celular, tales condiciones como se usan para mantener y cultivar las células de mamífero o células de otro organismo vertebrado o un organismo invertebrado.

En una realización específica, el tamizaje e identificación de las moléculas que comprenden regiones Fc variantes y afinidades a FcγR alteradas comprenden: exponer la molécula que comprende una región Fc variante en la superficie de la levadura; y caracterizar la unión de la molécula que comprende la región Fc variante a un FcγR (uno o más), usando un ensayo bioquímico para determinar la interacción Fc-FcγR, preferentemente, un ensayo basado en ELISA. Una vez que la molécula que comprende una región Fc variante ha sido caracterizada por su interacción con uno o más FcγRs y determinada a tener una afinidad alterada para uno o más FcγRs, mediante al menos un ensayo bioquímico, por ejemplo, un ensayo ELISA, la molécula puede ser manipulada genéticamente dentro de una inmunoglobulina completa, usando métodos de tecnología de ADN recombinante estándar conocidos en la técnica, y la inmunoglobulina que comprende la región Fc variante se expresa en células de mamífero para su posterior caracterización bioquímica. La inmunoglobulina dentro de la cual se introduce una región Fc variante de la invención (por ejemplo, reemplazando la región Fc de la inmunoglobulina) puede ser cualquier inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, anticuerpo monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multi-específicos, anticuerpo humanizados, y anticuerpos quiméricos. En realizaciones preferidas, una región Fc variante se introduce dentro de una inmunoglobulina específica para un receptor de superficie celular, un antígeno de tumor, o un antígeno de cáncer. La inmunoglobulina dentro de la que se introduce una región Fc variante de la invención se une específicamente a un antígeno de cáncer o tumor por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, antígeno de pancarcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415), antígeno de carcinoma ovárico (CA125) (Yu y otros, 1991, Cancer Res. 51(2): 468-475), fosfato ácido prostático (Tailor y otros, 1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928), antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2): 903-910; Israeli y otros, 1993, Cancer Res. 53: 227-230), antígeno asociado con melanoma p97 (Estin y otros, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl y otros, 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali y otros, 1987, Cancer 59: 55-63; Mittelman y otros, 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon y otros, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), antígeno de la mucina epitelial polimórfica, antígeno globular de la grasa de la leche humana, antígenos asociados al tumor colorrectal, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata y otros, 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), C017-1A (Raghammar y otros, 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn y otros, 1982, J. Clin. Immunol. 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie y otros, 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno del linfoma-B humano CD20 (Reff y otros, 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros y otros, 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos de melanoma, tales como gangliósido GD2 (Saleh y otros, 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y otros, 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston y otros, 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y otros, 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250), antígeno de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo antígeno T de virus tumoral de ADN de y antígenos de la

- envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom y otros, 1985, *Cancer Res.* 45:2210-2188), antígenos de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom y otros, 1986, *Cancer Res.* 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee y otros, 1988, *J. of Immun.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens y otros, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17:359), antígeno de linfocito humano maligno-APO-1 (Bernhard y otros, 1989, *Science* 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales, antígeno I del endodermo primario que se encuentra en eritrocitos adultos, embriones preimplantación, I(Ma) que se encuentra en los adenocarcinomas gástricos, M18, M39 que se encuentra en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D156-22 que se encuentra en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 que se encuentra en adenocarcinoma de colon, F3 que se encuentra en el adenocarcinoma pulmonar, AH6 que se encuentra en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley que se encuentra en células de carcinoma embrionarias, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF que se encuentra en las células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) que se encuentra en cáncer pancreático, FC10.2 que se encuentra en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) que se encuentra en Adenocarcinoma, NS-10 que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49 que se encuentra en el receptor EGF de las células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) que se encuentra en el adenocarcinoma de colon, 19.9 que se encuentra en el cáncer de colon, mucinas de cáncer togástrico, T5A7 que se encuentra en las células mieloides, R24 que se encuentra en el melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, y M1:22:25:8 que se encuentra en las células de carcinoma embrionario y SSEA-3 y SSEA-4 que se encuentran en embriones en la etapa celular 4 a 8. En una realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (Véase, Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).
- 25 En algunas realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce en un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz y otros, 1982 *J. Biol. Chem.* 257(12): 6987-6995). En otras realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce en un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico de ratón-humano 2H7, que reconoce la fosfoproteína de superficie celular CD20 en células B (Liu y otros, 1987, *Journal of Immunology*, 139: 3521-6is). En aún otras realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce en un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (p185 HER2) como se describe por Carter y otros. (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-9). En aún otras realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce en un humanizado anticuerpo anti-TAG72 (CC49) (Sha y otros, 1994 *Cancer Biother.* 9(4): 341-9). En otras realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce en Rituxan que se usa para el tratamiento de los linfomas.
- 35 En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB que incluye pero sin limitarse a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/403,266 presentada el 12 de agosto de 2002, la solicitud de los Estados Unidos núm. 10/643,857 presentada el 14 de agosto de 2003, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/562,804 presentada el 16 de abril de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582,044 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582,045 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/636,663 presentada el 15 de diciembre de 2004 y la solicitud de los Estados Unidos núm. de serie 10/524,134 presentada el 11 de febrero de 2005 por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la invención abarca manipular genéticamente un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que incluye pero sin limitarse a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/569,882 presentada el 10 de mayo de 2004, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/582, 043 presentada el 21 de junio de 2004 y la solicitud de los Estados Unidos núm. 11/126,978, presentada el 10 de mayo de 2005 por modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA.
- 50 Los ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB, que pueden ser humanizados o no, que pueden manipularse genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene número de acceso a la ATCC PTA-4592, 1D5 anticuerpo monoclonal que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5958, 1F2 anticuerpo monoclonal que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5959, 2D11 anticuerpo monoclonal que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5960, 2E1 anticuerpo monoclonal que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5961 y 2H9 anticuerpo monoclonal que tiene número de acceso a la ATCC PTA-5962 (depositados en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011), incorporados en la presente descripción como referencia. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB puede disminuir además la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB manipulado genéticamente puede tener además una función efectora mejorada determinadas por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en la presente descripción. En algunas realizaciones, una región Fc variante de la invención se introduce dentro de un anticuerpo

monoclonal terapéutico específico para un antígeno de cáncer o receptor de superficie celular que incluye pero sin limitarse a, Erbitux™ (conocido además como IMC-C225) (ImClone Systems Inc.), un anticuerpo monoclonal quimérico contra EGFR; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación del coágulo; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Switzerland) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo. Otros ejemplos son un anti-CD18 F(ab')₂ humanizado (Genentech); CDP860 que es un anti-CD18 F(ab')₂ humanizado (Celltech, GB); PRO542 que es un anticuerpo anti-HIV gp120 fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); C14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo anti-VEGF IgG1 humanizado (Genentech); OVAREX™ que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a del antígeno de superficie celular anti-17-IA murino (Glaxo Wellcome/Centocor); IMC-C225 que es un anticuerpo de IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo de integrina anti- α V β 3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo de IgG anti-CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo de IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo de IgG anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo de IgG anti-CD22 IgG humanizado (Immunomedics); Smart ID10 que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYM™ (Lym-1) es un anticuerpo DR anti-HLA murino radiomarcado (Techniclone); anti-CD11a es un anticuerpo de IgG humanizado (Genentech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un anti-CD3 IgG humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo del factor 5 anti-complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo de IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo de IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo de IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo anti-CD64 (Fc γ R) humano (Medarex/Centeon); rhuMab-E25 es un anticuerpo de IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharm); ABX-CBL es un anticuerpo de IgM anti CD-147 murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo de IgG anti-CD2 de rata (Medimmune/Bio Transplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo de IgG2a anti-CD3 murino (ortho Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo de IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo de IgG anti- β 2-integrina humanizado (LeukoSite); Anti-LFA-1 es un anti CD18 F(ab')₂ murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β 2 humano (Cambridge Ab Tech); y Corsevin M es un anticuerpo anti-Factor VII quimérico (Centocor).

Las regiones Fc variantes de la invención, preferentemente en el contexto de una inmunoglobulina, pueden caracterizarse adicionalmente usando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferentemente de un modo rápido. En algunas realizaciones alternativas, las regiones Fc variantes de la invención no se introducen dentro de una inmunoglobulina y se caracterizan además usando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferentemente de un modo rápido. Uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar las interacciones Fc-Fc γ R, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, para determinar los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, por ejemplo ensayo de BIAcore. Uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para la caracterización de una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R como es conocido para una persona con experiencia en la técnica o descrito en la presente. En realizaciones específicas, las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes se ensayan en un ensayo ELISA para la unión a una o más Fc γ Rs, por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA; seguido por uno o más ensayos ADCC. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes se ensayan además usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmón superficial se conocen bien en la técnica, y se discuten además en la sección 5.2.7, y ejemplifican en la presente descripción en el Ejemplo 6.8.

Un ensayo ilustrativo de gran productividad para la caracterización de inmunoglobulinas que comprenden regiones Fc variantes puede comprender: introducir una región Fc variante de la invención, por ejemplo, mediante métodos estándar de tecnología de ADN recombinante, en un anticuerpo 4-4-20; caracterizar la unión específica del anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante a un Fc γ R (por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB) en un ensayo ELISA; caracterizar el anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante en un ensayo ADCC (usando los métodos descritos en la presente descripción) en donde las células objetivo se opzonizan con el anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante; la región Fc variante se puede clonar después dentro de una segunda inmunoglobulina, por ejemplo, 4D5, 2H7, y la segunda inmunoglobulina caracterizada en un ensayo ADCC, en

donde las células objetivo se opzonizan con el segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante. El segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante se analiza adicionalmente después usando un ensayo basado en ELISA para confirmar la unión específica con un FcγR.

5 Preferentemente, una región Fc variante de la invención se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad más alta que una región Fc tipo silvestre determinado en un ensayo ELISA. Con la máxima preferencia, una región Fc variante de la invención se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad más alta y se une a FcγRIIB con una afinidad más baja que una región Fc tipo silvestre determinado en un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, la región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad al menos 2 veces más alta, al menos 4 veces más alta, con mayor preferencia al menos 6 veces más alta, con la máxima preferencia al menos 8 a 10 veces más alta que una región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA y se une a FcγRIIB con una afinidad al menos 2 veces más baja, al menos 4 veces más baja, con mayor preferencia al menos 6 veces más baja, con la máxima preferencia al menos 8 a 10 veces más baja que una región Fc tipo silvestre se une a FcγRIIB determinado en un ensayo ELISA.

15 La inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes se puede analizar en cualquier punto usando un ensayo basado en la resonancia con base en el plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore, para definir los parámetros cinéticos de la interacción Fc-FcγR, usando los métodos descritos en la presente descripción y conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. Preferentemente, la Kd de una región Fc variante de la invención para la unión a un FcγRIIIA y/o FcγRIIA monomérico determinado mediante análisis de BIAcore es aproximadamente 100 nM, preferentemente aproximadamente 70 nM, con la máxima preferencia aproximadamente 40 nM.; y la Kd de la región Fc variante de la invención para unir a un FcγRIIB dimérico es aproximadamente 80 nM, aproximadamente 100 nM, con mayor preferencia aproximadamente 200 nM.

25 En la mayoría de las realizaciones preferidas, la inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes se caracteriza además en un modelo animal para su interacción con un FcγR modelos animales preferidos para uso en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγRs humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5,877,397, y 6,676,927. Ratones transgénicos para uso en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, ratones desnudos knockout FcγRIIIA que portan FcγRIIIA humano; ratones desnudos knockout FcγRIIIA que portan FcγRIIA humano; ratones desnudos knockout FcγRIIIA que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones desnudos knockout FcγRIIIA y FcγRIIA que portan FcγRIIIA y FcγRIIA humano y ratones desnudos knockout FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB que portan FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humano.

5.2.1 Estrategias de diseño

35 La presente invención abarca métodos de manipulación genética para generar Fc variantes que incluyen pero sin limitarse a, estrategias de diseño computarizado, métodos de generación de genotecas, y métodos de tamizaje y producción experimental. Estas estrategias pueden aplicarse individualmente o en varias combinaciones para manipular genéticamente las Fc variantes de la presente invención.

40 En realizaciones más preferidas, los métodos de manipulación genética de la invención comprenden métodos en los cuales no se modifican aminoácidos en la interface entre una región Fc y el ligando Fc. Ligandos Fc incluyen pero sin limitarse a FcγRs, C1q, FcRn, C3, receptor de manosa, proteína A, proteína G, receptor de manosa, y moléculas sin descubrir que se unen a Fc. Aminoácidos en la interface entre una región Fc y un ligando Fc se define como los aminoácidos que realizan contacto directo y/o indirecto entre la región Fc y el ligando, desempeñan un papel estructural en la determinación de la conformación de la interfase, o están dentro al menos 3 angstroms, preferentemente al menos 2 angstroms entre sí como determinado por análisis estructural, tales como cristalografía de rayos X y modelaje molecular. Los aminoácidos en la interface entre una región Fc y un ligando Fc incluyen los aminoácidos que realizan contacto directo con un FcγR basado en análisis estructurales y cristalográficos de las interacciones Fc-FcγR tales como las descritas por Sondermann y otros, (2000, Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 de bucle (G/F). En algunas realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes la modificación de al menos un residuo que no hace contacto directo con un FcγR basado en el análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión de Fc-FcγR.

50 Preferiblemente, los métodos de manipulación genética de la invención no modifican ninguno de los aminoácidos identificados por Shields y otros, que se localizan en el dominio CH2 de una región Fc proximal a la región bisagra, por ejemplo, Leu234-Pro238; Ala327, Pro329, y afectan la unión de una región Fc a todos los FcγRs humanos.

En otras realizaciones, la invención abarca Fc variantes con afinidades a FcγR alteradas y/o funciones efectoras alteradas, tal que la Fc variante no tiene una modificación de aminoácidos en una posición en la interfase entre una región Fc y el ligando Fc. Preferentemente, tales Fc variantes en combinación con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que están en la interface entre una región Fc y el ligando Fc tiene un impacto adicional sobre la propiedad alterada en particular, por ejemplo afinidad FcγR alterada. Aminoácidos modificadores en la interface entre Fc y un ligando Fc pueden hacerse usando los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo basado en el análisis estructural de complejos Fc-ligando. Por ejemplo pero no a modo de limitación mediante la exploración de sustituciones energéticamente favorables en las posiciones Fc que impactan la interface de unión, se pueden manipular genéticamente las variantes lo que prueba nuevas conformaciones de la interface, y algunas de las cuales pueden mejorar la unión al ligando Fc, algunas de las cuales pueden reducir la unión del ligando Fc, y algunas de las cuales pueden tener otras propiedades favorables. Tales nuevas conformaciones de la interfase pueden ser el resultado de, por ejemplo, interacción directa con residuos del ligando Fc que forman la interfase, o efectos indirectos causados por las modificaciones de aminoácidos tales como perturbación de la cadena lateral o conformaciones de la cadena principal.

La invención abarca manipular genéticamente Fc variantes que comprenden cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente en conjunto con otras modificaciones en las que se altera la conformación del carbohidrato de Fc en la posición 297. La invención abarca cambios conformacionales y de composición en el carbohidrato N297 que resulta en una propiedad deseada, por ejemplo afinidad aumentada o reducida por FcγR. Tales modificaciones pueden mejorar además el fenotipo de la modificación de aminoácidos original de las Fc variantes de la invención. Aunque no se pretende estar limitado por un mecanismo de acciones en particular tal estrategia está apoyada por la observación de que la estructura y conformación del carbohidrato afecta dramáticamente la unión Fc-FcγR y Fc/Clq (Umaha y otros, 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies y otros, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Mimura y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:45539 ; Radaev y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:16478-16483; Shields y otros 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473).

Otra estrategia de diseño para generar Fc variantes de acuerdo con la invención se proporciona en la que la región Fc se manipula genéticamente otra vez para eliminar la dependencia estructural y funcional en la glicosilación. Esta estrategia de diseño involucra la optimización de la estructura, estabilidad, solubilidad de Fc y/o función de Fc (por ejemplo afinidad de Fc por uno o más ligandos de Fc) en ausencia del carbohidrato N297. En un enfoque, las posiciones que se exponen para solventar en ausencia de glicosilación se manipulan genéticamente de manera que son estables, estructuralmente consistentes con la estructura Fc, y no tienden a agregarse. Enfoques para optimizar Fc aglicosilado pueden involucrar pero sin limitarse a diseñar modificaciones de aminoácidos que mejoran la estabilidad y/o solubilidad del Fc aglicosilado mediante la incorporación de residuos polares y/o cargados que orientan hacia adentro el eje del dímero Cg2-Cg2, y mediante el diseño de modificaciones de aminoácidos que mejoran directamente la interface Fc-FcγR aglicosilado o la interface de Fc aglicosilado con algún otro ligando de Fc.

Las variantes Fc de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc, que incluyen pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar un Fc variante de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas, o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Tales modificaciones pueden ser en los dominios CH1, CH2, o CH3 o una combinación de estos. Preferentemente las Fc variantes de la invención mejoran la propiedad de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una Fc variante de la invención se combina con un mutante conocido para unirse a FcγRIIIA con una afinidad superior que una molécula comparable que comprende una región Fc tipo silvestre; la combinación con un mutante de la invención resulta en una mejoría mucho mayor en la afinidad de FcγRIIIA.

En una realización, las Fc variantes de la presente invención pueden combinarse con otras Fc variantes conocidas tales como las descritas en Duncan y otros, 1988, *Nature* 332:563-564; Lund y otros, 1991, *J. Immunol* 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, *Mol Immunol* 29:53-59; Alegre y otros, 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins y otros, 1995, *Proc Natl. Acad Sci U S A* 92:11980-11984; Jefferis y otros, 1995, *Immunol Lett.* 44:111-117; Lund y otros, 1995, *Faseb J* 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, *Immunol Lett* 54:101-104; Lund y otros, 1996, *J Immunol* 157:49634969; Armour y otros, 1999, *Eur J Immunol* 29:2613-2624; Idusogie y otros, 2000, *J Immunol* 164:41784184; Reddy y otros, 2000, *J Immunol* 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, *Cell Immunol* 200:16-26; Idusogie y otros, 2001, *J Immunol* 166:2571-2575; Shields y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Jefferis y otros, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65; Presta y otros, 2002, *Biochem Soc Trans* 30:487-490); US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

5.2.2 Ensayo de unión FcγR-Fc

Un ensayo de unión FcγR-Fc se desarrolló para determinar la unión de las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes para FcγR, lo que permitió la detección y cuantificación de la interacción, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para FcγRIIB y FcγRIIIA. El método implica la formación de un complejo de FcγR que tiene una avidéz mejorada por una región Fc, en relación con un FcγR no complejado. De acuerdo con la invención, el complejo molecular preferido es un complejo inmune tetramérico, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG biotinilada de 15 aminoácidos (AVITAG) operablemente unida al C-terminal de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una relación molar para formar un complejo FcγR tetramérica (preferentemente en una relación molar de 5:1). De acuerdo con una realización preferida de la invención, la proteína de fusión está enzimáticamente biotinilada usando por ejemplo, la enzima Bir A de E.coli, una biotina ligasa que biotinila específicamente un residuo de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. En una realización específica de la invención, 85 % de la proteína de fusión se biotinila, determinada mediante métodos estándar conocidos para aquellos con experiencia en la técnica, que incluyen pero sin limitarse a, ensayo de cambio de estreptavidina. De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, las proteínas FcγR solubles biotiniladas se mezclan con SA-PE en una relación molar de 1X SA-PE:5X FcγR soluble biotinilado para formar un complejo FcγR tetramérico.

En una realización preferida de la invención, polipéptidos que comprenden regiones Fc unen los complejos FcγR tetraméricos, formados de acuerdo con los métodos de la invención, con al menos una afinidad 8 veces mayor que el FcγR no complejado monomérico. La unión de polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos FcγR tetraméricos se puede determinar usando técnicas estándar conocidas para aquellos con experiencia en la técnica, tales como por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos de ELISA, etc.

La invención abarca el uso de los complejos inmunes formados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o libres de células.

Debido a la conveniencia, los reactivos pueden proporcionarse en un kit de ensayo, es decir, una combinación empaquetada de reactivos para ensayar la capacidad de las moléculas que comprenden regiones Fc variantes que unen complejos FcγR tetraméricos. Otras formas de complejos moleculares para su uso en la determinación de las interacciones Fc-FcγR se contemplan además para su uso en los métodos de la invención, por ejemplo, proteínas de fusión formadas como se describe en solicitud provisional de Estados Unidos 60/439,709, presentada el 13 de enero, 2003 (minuta judicial núm. 11183-005-888).

5.2.3 Mutagénesis y construcción de genotecas de exposición en fagos

Interacciones moleculares entre el Fc de IgG y receptores de Fc se estudiaron previamente tanto con técnicas estructurales como genéticas. Estos estudios identificaron residuos de aminoácidos que son críticos para la unión funcional de Fc al FcγR diferente. Ninguno de estos cambios mostró mejorar la eficacia mediada por FcγR humana de anticuerpos terapéuticos en modelos animales. Un análisis completo de todos los cambios potenciales de aminoácidos en estos residuos u otros residuos potencialmente importantes no se informó. La plataforma descrita en la presente tiene la capacidad tanto de construir genotecas de mutantes con todos los posibles cambios de aminoácidos, tamizar las genotecas usando múltiples ensayos funcionales, como analizar finalmente las genotecas en modelos animales humanizados relevantes.

La presente invención abarca la construcción de genotecas múltiples basadas tanto en datos genéticos como estructurales conocidos en la técnica o siendo desarrollados. El método descrito y ejemplificado en la presente incorpora construir genotecas individuales que contienen mutantes que prueban cambios de los 20 aminoácidos entre los residuos 3-6 de la región Fc. El conjunto completo de mutaciones se ensamblarán en todas las combinaciones de mutaciones posibles. El número de mutaciones independientes generadas se basa en el número de sitios que se saturan durante el ensamblaje de la genoteca (Tabla 9 más abajo). El tamaño de la genoteca determinará la selección del tamiz primario y por lo tanto la selección del vector para las etapas iniciales de clonación.

Tabla 9: Número de mutantes independientes basado en el número de sitios específicos.

Genoteca.	Cantidad de residuos	Cantidad de mutantes independientes	Tamiz primario
Pequeño	3 o menos	8000 max.	ELISA
Grande	4 - 6	$1.6 \times 10^5 - 6.4 \times 10^7$	presentación en la superficie

La presente invención abarca la construcción de genotecas combinatorias, que se enfocan a un número limitado de residuos críticos (por ejemplo, 3-6). El uso de una genoteca de Fc de IgG1 aleatoriamente mutagenizado y se identificarán los ensayos de tamizaje de Fc variantes descritos y ejemplificados en la presente. En las rondas iniciales, se seleccionarán las mejores 5 mutaciones, basadas tanto en el perfil de unión a FcR y actividad funcional. Se tomarán 205 mutantes individuales para cubrir todos los cambios de aminoácidos posibles y sus combinaciones en cinco ubicaciones. Se generará una genoteca con al menos 10 veces de cobertura para cada mutante. Adicionalmente las regiones se elegirán basado en la información disponible, por ejemplo, datos de la estructura cristalina, diferencias de unión a FcyR isotipo ratón/humano, datos genéticos, y sitios adicionales identificados por mutagénesis.

La mayor desventaja de protocolos actuales de mutagénesis sitio dirigida es la producción de poblaciones sesgadas, la sobre-representación de variaciones en algunas regiones y la sub-representación o inexistencia de mutaciones en otras. La presente invención supera este problema mediante la generación de matrices imparciales de mutantes de Fc deseables usando una tecnología de construcción de genes bien desarrollada para eliminar el sesgo introducido en la construcción de genoteca mediante enfoques basados en PCR tal como PCR de superposición y PCR inversa. Las principales distinciones del enfoque de la presente invención son: 1) El empleo de la mezcla equimolar de 20 oligos individuales para cada codón específico en vez de iniciadores degenerados. De este modo, cada aminoácido está representado por un único y más usado codón, mientras que los iniciadores degenerados sobrerrepresentan los aminoácidos codificados por más codones que los codificados con menos codones. 2) Construcción de mutantes por un enfoque de sustitución de cadena. Esto asegura la introducción imparcial de todos los cambios deseables en el producto final

Un protocolo ilustrativo que comprende de las etapas siguientes: 1) los oligos fosforilados, que representan cambios deseables en una o varias ubicaciones, todos complementarios a la misma cadena, se añaden al molde junto con una ADN polimerasa y ligasa termostable, 5'>3' deficiente de exonucleasa (Fig. 27 a). 2) la mezcla ensamblada se somete a un número de ciclos de polimerización/ligación, suficiente para generar la cantidad de producto deseable. El uso de una ADN polimerasa 5'>3' deficiente de exonucleasa asegura la integridad de la secuencia del cebador y su residuo fosfato, cuando una ligasa termoestable ensambla los fragmentos individuales de cebador extendido en una cadena monocatenaria contigua. Los ciclos de reacción pueden continuar hasta el agotamiento completo de la mezcla de oligos sin introducir sesgos en el producto final (Fig. 27 b). 3) la mezcla generada de mutantes de cadenas simples se convierte en ADN de doble cadena añadiendo un cebador inverso gen-específico a la reacción (Fig. 27 1c). 4) el producto de doble cadena se digiere en los sitios de restricción de extremo-diseñado y clona en un vector de expresión adecuado (Fig. 27 1d)

Para asegurar la calidad de la genoteca, los fragmentos de PCR amplificados se analizarán por electroforesis para determinar la longitud de los productos finales de PCR. La reacción se caracterizará como exitosa si >99 % de los productos de PCR son de la longitud esperada. La genoteca final se clonará dentro de un vector de expresión. Una fracción de la genoteca de mutantes se secuenciará para determinar la tasa de incorporación de codón mutante. El número de fragmentos secuenciados se basará en el número de sitios objetivos mutados y la validación de la genoteca se determinará por la tasa de mutación observada en los sitios específicos (Tabla 10). La tasa de vector sin insertos debe ser menos de 2 %. La tasa de mutación en sitios no-específicos debe ser menos de 8 %. Las genotecas que contienen clones con >90 % de insertos correctos nos permitirá mantener los plazos de tamizaje.

TABLA 10 Tasas de mutación esperadas para las Genotecas

Residuos específicos	# de reacciones por sec.	Tasas de mutación aprox. para la validación de la genoteca					
		sencilla	Doble	Triple	Cuad.	Quint.	Sex.
3	20	42 %	43 %	15 %	NA	NA	NA
4	50	29 %	43 %	21 %	7 %	NA	NA
5	75	18 %	35 %	32 %	11 %	4 %	NA
6	100	12 %	20 %	40 %	20 %	6 %	2 %

En otras realizaciones, la invención abarca el PCR de superposición o inverso en la construcción de genotecas. Para mantener imparcialidad, iniciadores individuales para cada codón se usarán en lugar de iniciadores degenerativos. Un esquema de validación similar como descrito anteriormente se empleará.

- 5 Con la máxima preferencia se emplearán protocolos automatizados para la producción de la genoteca de alto rendimiento. La automatización permite el rendimiento mejorado, operación conducida, y una reducción general en el error experimental para tareas que requieren operaciones repetitivas tediosas. Las capacidades de síntesis de oligo se basa en 2 sintetizadores de ADN Mermade (Bioautomation, Inc.) con una capacidad de salida total de 575 60mer oligos/12 horas. El software propietario se encarga de todos los aspectos del diseño, síntesis y almacenamiento de los oligonucleótidos finales. Manipuladores robóticos de líquido se emplearán para formar los oligos para la síntesis de Fc mutantes completos y se formarán las reacciones de ligación para la incorporación de Fc mutantes en vectores de expresión en la cadena pesada del anticuerpo. Después de la ligación se estima que puede tomar 1 FTE ~10 días para ordenar los clones de la genoteca y generar ~8000 minipreps, equivalentes a una genoteca combinatoria saturada en 3 sitios. Posteriormente a la transformación bacteriana un robot selector de clon Qpix-2 se usará para seleccionar las colonias en placas de 96 pocillos profundos. El crecimiento del cultivo se realizará usando un agitador de levitación magnética, capaz de incubar 12 placas y que resultan en un crecimiento denso en 12 -16 horas a 37 °C. Un robot miniprep Qiagen se usa para realizar los preps de ADN en la tasa de 4 placas de 96 pocillos en 2.5 horas. Con tareas de superposición 5 genotecas de este tipo se pueden construir en 9 meses con 1 FTE
- 10
- 15
- 20 La maduración de la afinidad requiere el ensamblaje de un nuevo conjunto de combinaciones de mutaciones, a partir de una mezcla mutante preseleccionada o miembros de una familia de genes, que se puede enriquecer mediante un protocolo de selección. El proceso se repite varias veces hasta que se logra el aislamiento de un mutante con el fenotipo deseado. La desventaja del enfoque enzimático actual, barajado de ADN, para llevar a cabo este proceso es el sesgo que puede introducirse debido a sitios específicos dentro del gen que son puntos calientes para nucleasas, el predominio de mutantes específicos en la mezcla final reensamblada y pérdida de algunos de los mutantes originales en la mezcla final. Para superar este inconveniente una tecnología construir un gen (BAG) se usará para generar una genoteca de Fc mutantes altamente compleja que contiene cambios aleatorios de aminoácidos en todas las ubicaciones potenciales que pueden ser importantes para la unión al receptor(es). Los conjuntos de oligos degenerados que cubren regiones específicas del Fc de IgG se usarán (véase Fig. 28).
- 25
- 30 Los oligos serán de ~30 nt y se construirán oligos degenerados sintetizados para cambiar uno (4 oligos) o dos AA (8 oligos). Los oligonucleótidos se diseñan para ser superpuestos sin interrupción. Tomará ~200 oligos para acomodar todos los cambios de AA únicos y ~2000 para cambiar dos AA por oligonucleótido. Los más de 2000 oligos se usarán individualmente y en combinaciones para generar matrices de Fc mutantes usando el protocolo definido anteriormente (A.20). Se usará un programa escrito en casa aleatorizado y un manipulador robótico de líquidos para mezclar las combinaciones de mutante seleccionadas y oligos tipo silvestre. Grandes genotecas se clonarán dentro de vectores que permitirán tamizar usando la presentación en la superficie de levadura. Este enfoque utiliza una selección por perla magnética seguido por citometría de flujo y se ha aplicado con éxito en las bibliotecas con una complejidad de $>10^9$ (Feldhaus y otros, 2003, Nat. Biotech. 21(2): 163-170). Esto limita el número de sitios para probar en cualquier mezcla a 7, lo que resulta en $\sim 1.3 \times 10^9$ mutaciones posibles/mezcla.
- 35
- 40 Para asegurar la calidad de la genoteca los fragmentos de PCR amplificados se analizarán por electroforesis para determinar la longitud de los productos finales de PCR. La reacción se caracterizará como exitosa si >99 % de los productos de PCR son de la longitud esperada. Una fracción de la genoteca de mutantes se secuenciará para determinar la tasa de incorporación de codón mutante. El número de fragmentos secuenciados se basará en el número de sitios objetivos mutados y la validación de la genoteca se determinará por la tasa de mutación observada

en los sitios específicos (Tabla 10). La tasa de vectores sin insertos debe ser menos de 2 %. La tasa de mutación en sitios no-específicos debe ser menos de 8 %.

5 La capacidad de generar el nivel deseado de eficacia de mutagénesis por este enfoque se determinará mediante la secuenciación de un subconjunto de clones. La alternativa de BAG se realizará usando un protocolo "barajado de ADN". Esto requiere mezclar todos los mutantes, simples, dobles, triples, etc. Seguida la preparación del ADN, se amplificarán por PCR regiones Fc usando iniciadores de flanqueo que amplifican selectivamente la región mutada del Fc, de ~700 bp. Mutantes novedosos se construyen mediante la reorganización de mutaciones en el Fc a través del tratamiento con ADNs del ADN amplificado y aislamiento de fragmentos de 150-200 pb (véase, por ejemplo, Stemmer y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 10747-51). Los fragmentos se volverán a ligar, amplificarán por PCR con iniciadores anidados y clonarán en el vector de presentación en la superficie de levadura, pYD1. La genoteca recombinada se volverá a seleccionar en el tamiz de exposición de Fc en levadura como se describe y ejemplifica en la presente.

15 Genotecas BAG utilizarán la mayoría del mismo equipamiento que la genoteca combinatoria. Sin embargo la clonación será en un vector adecuado para la presentación en la superficie de levadura y no requerirá disponer de clones individuales ya que la presentación en la superficie de levadura se empleará inicialmente para el enriquecimiento de grandes bibliotecas. Posterior al nivel adecuado del enriquecimiento los clones individuales se dispondrán.

20 Una genoteca inicial de moléculas que comprenden regiones Fc variantes se produce usando cualquiera de las técnicas de mutagénesis de base aleatoria conocidas en la técnica. Se apreciará por un experto en la técnica que la secuencia de aminoácidos variantes de regiones Fc se pueden obtener por cualquier técnica de mutagénesis conocida para aquellos con experiencia en la técnica. Algunas de estas técnicas se describen brevemente en la presente, sin embargo, se reconocerá que procedimientos alternativos pueden producir un resultado equivalente. En una realización preferida las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variante se preparan mediante PCR propenso a errores como se ejemplifica en el Ejemplo 6, más abajo (véase Leung y otros, 1989, Technique, 1:11). Es especialmente preferido tener tasas de error 2-3 pb/Kb para uso en los métodos de la invención. En una realización, usando el PCR propenso a error se obtiene una frecuencia de mutación de 2-3 mutaciones/kb.

30 La mutagénesis puede realizarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, sintetizar un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones dentro de la secuencia de la región Fc de un anticuerpo o un polipéptido que comprende una región Fc (por ejemplo, el dominio CH2 o CH3) a modificarse. La mutagénesis sitio-específica permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de iniciador de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un híbrido estable a ambos lados de la unión por delección que se recorre. Típicamente, se prefiere un iniciador de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 nucleótidos o más en longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o más residuos a ambos lados de la unión de la secuencia que se altera. Una serie de tales iniciadores que introducen una variedad de mutaciones diferentes en una o más posiciones se pueden usar para generar una genoteca de mutantes.

40 La técnica de mutagénesis sitio-específica es bien conocida en la técnica, como se ejemplifica en varias publicaciones (véase, por ejemplo, Kunkel y otros, Methods Enzymol., 154:367-82, 1987). Generalmente, la mutagénesis sitio-dirigida se realiza primero mediante la obtención de un vector de cadena simple o fusión de dos cadenas por separado de un vector de doble cadena que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Un iniciador de oligonucleótido que porta la secuencia mutada deseada se prepara, generalmente de forma sintética. Este iniciador se hibrida después con el vector de cadena simple, y se somete a enzimas de polimerización de ADN tal como ADN polimerasa T7, para completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. Así, se forma un heterodúplex en donde una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex se usa después para transformar o transfectar células apropiadas, tal como E. coli, y se seleccionan los clones que incluyen vectores recombinantes que portan el arreglo de la secuencia mutada. Como se apreciará, la técnica emplea típicamente un vector de fago que existe tanto en forma de cadena simple como de doble cadena. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis sitio-dirigida incluyen vectores tal como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles en el comercio y su uso generalmente es bien conocido para aquellos con experiencia en la técnica. Los plásmidos de doble cadena se emplean además de forma rutinaria en la mutagénesis de sitio dirigido lo que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

55 Alternativamente, el uso de PCRTM con enzimas termoestables disponibles en el comercio tal como Taq ADN polimerasa se puede usar para incorporar un iniciador de oligonucleótido mutagénico dentro de un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar después dentro de una clonación adecuada o vector de expresión. Véase, por

ejemplo, Tomic y otros, *Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987, y Upende y otros, *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995, para procedimientos de mutagénesis mediados por PCR™. El PCR™ que emplea una ligasa termoestable adicionalmente a una polimerasa termoestable se puede usar además para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado dentro de un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar después dentro de una clonación adecuada o vector de expresión (véase por ejemplo, Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994).

Otro método para preparar variantes para su uso en la invención, es la mutagénesis por inserción de un casete basada en la técnica descrita por Wells y otros. (1985, *Gene*, 34: 315). La materia prima es el plásmido que comprende el ADN deseado que codifica la proteína a mutar (por ejemplo, el ADN que codifica un polipéptido que comprende una región Fc). El(os) codón(es) en la secuencia de ADN a mutar se identifican; puede existir un único sitio de endonucleasa de restricción a cada lado del sitio(s) de mutaciones identificadas. Si no existe el sitio de restricción de este tipo, se puede generar por mutagénesis oligonucleótido dirigida. Después que se han introducido los sitios de restricción en el plásmido, el plásmido se corta en esos sitios y alinea. Un oligonucleótido de doble cadena que codifica la secuencia de ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación se sintetiza usando los procedimientos estándar conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. El oligonucleótido de doble cadena se conoce como el casete. Este cassette está diseñado para tener extremos 3' y 5' que sean compatibles con los extremos del plásmido alineado, tal que puede ligarse directamente al plásmido.

Otros métodos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para producir secuencias variantes de la región Fc de un anticuerpo o polipéptidos que comprenden una región Fc se pueden usar. Por ejemplo, vectores recombinantes que codifican la secuencia de aminoácidos del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento de este se pueden tratar con agentes mutagénicos, tal como hidroxilamina, para obtener secuencias variantes.

Una vez que se produce una genoteca de mutantes de acuerdo con los métodos descritos, la genoteca mutagenizada se transforma dentro de una cepa de levadura, preferentemente EBY100 (Invitrogen), mata ura3-52 trp1 leu2Δl his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL::GAL-AGA1 usando un protocolo de transformación estándar de acetato de litio conocido para aquellos con experiencia en la técnica (ref).

Se apreciará por un experto en la técnica, que una vez que las moléculas de la invención con propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácidos, cuya modificación mejora la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc tipo silvestre) se han identificados (véase sección 5.1 y tabla 2) de acuerdo con los métodos de la invención, otras moléculas (es decir, anticuerpo terapéuticos) se pueden manipular genéticamente usando técnicas estándar de ADN recombinante y cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocidas, como descrito en esta sección para producir moléculas manipuladas genéticamente que portan los sitios de mutación identificados.

5.2.4 Presentación en la superficie de levadura

El método preferido para el tamizaje e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades a FcγR alteradas (es decir, afinidad mejorada a FcγRIIIA y/o FcγRIIA es tecnología de presentación en la superficie de levadura (para revisión véase Boder y Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444) que abarca la deficiencia en la técnica anterior para la detección de interacciones de unión de proteínas extracelulares modificadas post-traducción. Específicamente, la presentación en la superficie de levadura es un método genético por medio del cual los polipéptidos que comprenden mutantes Fc se expresan en la pared celular de la levadura de forma accesible para interactuar con FcγR. La presentación en la superficie de levadura del Fc mutante que contiene los polipéptidos de la invención se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica o los métodos específicos descritos en la presente. Véase la patente de los Estados Unidos núms.6,423,538; 6,114,147; y 6,300,065. Véase Boder y otros, 1997 *Nat. Biotechnol.*, 15:553-7; Boder y otros, 1998 *Biotechnol. Prog.*, 14:55-62; Boder y otros, 2000 *Methods Enzymol.*, 328:430-44; Boder y otros, 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97:10701-5; Shusta y otros, 1998 *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16:773-7; Shusta y otros, 1999 *J. Mol. Biol.*, 292:949-56; Shusta y otros, 1999 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:117-22; Shusta y otros, 2000 *Nat. Biotechnol.*, 18:754-9; Wittrup y otros, 1994 *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 745:321-30; Wittrup y otros, 1994 *Cytometry*, 16:206-13; Wittrup, 1995 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6:203-8; Wittrup, 1999 *Trends Biotechnol.*, 17:423-4; Wittrup, 2000 *Nat. Biotechnol.*, 18:1039-40; Wittrup, 2001 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12:395-9.

La presentación en la superficie de levadura se usará para enriquecer las genotecas que contienen $>10^7$ clones independientes. Este enfoque proporcionará la capacidad de enriquecer grandes genotecas >20 veces en la clasificación simple. Genotecas de Fc mutante con $>10,000$ mutantes independientes (4 o más sitios) se clonarán dentro de los vectores adecuados para la presentación en la superficie de levadura y enriquecerán mediante clasificación por FACS hasta < 8000 mutantes son capaces de probarse mediante otros ensayos bioquímicos y funcionales como descritos más abajo.

La invención proporciona métodos para la construcción de una genoteca de Fc mutante en levadura para la presentación de moléculas que comprenden regiones Fc, que mutaron como se describe en la sección 5.2.2. Preferentemente, las genotecas de Fc mutante para uso en los métodos de la invención contienen al menos 10^7 células, hasta 10^9 células. Un método ilustrativo para la construcción de una genoteca de Fc para uso en los métodos de la invención comprende lo siguiente: ácido nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc se clonan dentro del sitio de clonación múltiple de un vector derivado de un vector de replicación en levadura, por ejemplo, pCT302; de manera que los ácidos nucleicos que codifican Fc se expresan bajo el control del promotor inducible de galactosa GAL1 y en marco con una secuencia de nucleótidos que codifica Aga2p, la proteína aglutinina de apareamiento a pared celular. En una realización preferida, ácido nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc se clonan C-terminal a la región codificante Aga2p, tal que se codifica una proteína de fusión Aga2p de región Fc. Una proteína de fusión que comprende la proteína Aga2p y polipéptidos que comprenden regiones Fc se secretarán extracelularmente y presentarán en la pared celular a través del enlace disulfuro a la proteína Aga1p, una proteína integral de pared celular, usando el constructo preferido de la invención. En una realización alternativa, los constructos pueden comprender además secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítipo. Cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la etiqueta de epítipo conocida para aquellos con experiencia en la técnica se pueden usar de acuerdo con la invención, incluyendo, pero sin limitarse a secuencias de nucleótidos que codifican hemaglutinina (HA), c-myc Xpress TAG, His - TAG, o V5TAG. La presencia de la proteína de fusión en la superficie de la célula de levadura puede detectarse usando análisis por FACS, microscopía confocal de fluorescencia o métodos de inmunotinción estándar, los cuales son conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. En una realización, la presencia de las proteínas de fusión a Fc de la invención en la superficie de la célula de levadura se detectan usando anticuerpos monoclonales específicos a Fc (CH3 específico), que incluyen pero sin limitarse a, anticuerpo monoclonal específico a Fc de IgG1, HP6017 (Sigma), JL512 (Immunotech), y cualquier anticuerpo descrito en Partridge y otros, 1986, Molecular Immunology, 23 (12): 1365-72. En otra realización, la presencia de las proteínas de fusión a Fc de la invención se detecta mediante marcaje inmunofluorescente de etiquetas de epítopos usando técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica. Es particularmente útil en los métodos de la invención, usar las secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítopos para flanquear los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión a Fc, como un control interno, para detectar si las proteínas de fusión se presentan en la pared celular en forma parcialmente proteolizada.

5.2.5 Tamizaje de genotecas de presentación en levadura

La invención abarca tamizar las genotecas de presentación en levadura usando ensayos inmunológicos que incluyen pero sin limitarse a, ensayos con base celular, ensayos basados en soluciones, y ensayos basados en fase sólida.

En algunas realizaciones, la invención abarca la identificación de Fc mutantes con afinidades a FcγR alteradas usando los métodos de maduración de la afinidad que son conocidos para aquellos con experiencia en la técnica y abarcados en la presente. En resumen, la maduración de la afinidad crea nuevos alelos mediante recombinación aleatoria de mutaciones individuales presentes en una genoteca de mutantes, véase, por ejemplo, Hawkins y otros, 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896; Stemmer y otros, 1994 Nature, 370: 389-91; las dos se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Se ha usado con éxito para aumentar la afinidad de anticuerpos, receptores de células T y otras proteínas. La invención abarca usar mutaciones que muestran unión aumentada a FcγR como un valor inicial para construir nuevas genotecas mutantes con fenotipos mejorados. Usando los métodos de la invención, una población de mutantes de Fc de IgG1 enriquecidos mediante la presentación en la superficie de levadura se puede seleccionar para aumentar la unión a un FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA. Después de la preparación del ADN, regiones Fc se pueden amplificar por PCR usando iniciadores de flanqueo que amplifican selectivamente la región mutada del Fc, que es aproximadamente ~700 pb usando los métodos conocidos para una persona con experiencia en la técnica y ejemplificados o descritos en la presente. Mutantes nuevos se pueden así construir mediante la reorganización de mutaciones en la región Fc por ejemplo a través del tratamiento con ADNsal del ADN amplificado y aislamiento de fragmentos usando los métodos tales como aquellos descritos por Stemmer y otros, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-51. Los fragmentos se pueden religar después, amplificar por PCR con iniciadores anidados y clonar dentro del vector de presentación en levadura, por ejemplo, pYD1 usando los métodos conocidos para una persona con experiencia en la técnica. La genoteca recombinada se puede seleccionar de nuevo después en el tamiz de presentación de Fc en levadura. Como la KD disminuye, más abajo de 10 nM, se pueden establecer las condiciones para permitir más aun el aumento de la afinidad basada en la reducción de la tasa del ligando FcγRIIIA del receptor Fc usando los métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en Boder y otros, 1998, Biotechnol. Prog. 14: 55-62. La invención abarca un tamiz cinético de la genoteca de levadura. Un tamiz cinético se puede establecer mediante el marcaje de las células que presentan Fc en saturación con un ligando marcado, por ejemplo, un ligando fluorescente seguido por la incubación con un exceso de ligando no-marcado durante un periodo predeterminado. Después de terminar la reacción mediante la adición de tampón en exceso (por ejemplo, PBS 1X, 0.5 mg/ml de BSA) las células se analizarán por FACS y fijarán las puertas de clasificación para la selección. Después de cada ronda de enriquecimiento los mutantes individuales se pueden probar para los

aumentos en veces de la afinidad y secuenciar por la diversidad. El proceso de recombinación in vitro se puede repetir. En algunas realizaciones, el in vitro se repite al menos 3 veces.

5 La selección de Fc variantes de la invención puede realizarse usando cualquier Fc γ R que incluye pero sin limitarse a, variantes polimórficas de Fc γ R. En algunas realizaciones, la selección de Fc variantes se realiza usando una variante polimórfica de Fc γ R11A que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la selección de Fc variantes se realiza usando una variante polimórfica de Fc γ R11A que contiene una valina en la posición 158. Fc γ R11A 158V presenta una afinidad más alta para IgG1 que 158F y una actividad ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Koene y otros, 1997, Blood, 90:1109-14; Wu y otros, 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70, las dos se incorporan aquí como referencia en su totalidad); este residuo, de hecho, interactúa directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como mostrado recientemente en los estudios de co-cristalización de IgG1-FcR11a, véase, por ejemplo, Sonderman y otros, 2000, Nature, 100: 1059-70. Los estudios demostraron que en algunos casos los anticuerpos terapéuticos tuvieron la eficacia mejorada en pacientes homocigotos a FcR11a-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos a FcR11A158V en comparación con pacientes homocigotos a FcR11A 158F (véase, por ejemplo, Cartron y otros, 2002 Blood, 99(3): 754-8). Aunque no se pretende estar limitado por un mecanismo de acción en particular, la selección Fc variantes de la invención con el alotipo FcR11A 158F puede proporcionar variantes que una vez manipuladas genéticamente dentro de los anticuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para los pacientes homocigotos a FcR11A 158F.

20 La invención abarca tamizar genotecas de levaduras basadas en la reducción de la selección de Fc γ R11B y FcR11A tal que los Fc mutantes se seleccionan no sólo porque tienen una afinidad mejorada por FcR11A sino también tienen una afinidad reducida por FcR11B. Las genotecas de levaduras se pueden enriquecer para clones que tienen una afinidad reducida por FcR11B por métodos de reducción secuencial, por ejemplo, incubando la genoteca de levadura con perlas magnéticas recubiertas con FcR11B. La reducción de FcR11B preferentemente se lleva a cabo secuencialmente tal que la genoteca se enriquece en clones que tienen una afinidad reducida por FcR11B. En algunas realizaciones, la etapa de reducción de FcR11B resulta en una población de células que sólo 30 %, preferentemente sólo 10 %, con mayor preferencia sólo 5 %, con la máxima preferencia menos de 1 % se une a FcR11B. En algunas realizaciones, reducción de FcR11B se lleva a cabo en al menos 3 ciclos, al menos 4 ciclos, al menos 6 ciclos. La etapa de reducción de FcR11B se combina preferentemente con una etapa de selección de FcR11A, por ejemplo usando clasificación por FACS tal que se seleccionan las Fc variantes con una afinidad mejorada por FcR11A.

5.2.5.1 Ensayos FACS; ensayos en fase sólida y ensayos inmunológicos

35 La invención abarca la caracterización de las proteínas de fusión del Fc mutante que se presentan en la superficie de la pared celular de levadura, de acuerdo con los métodos descritos en la sección 5.2.3. Un aspecto de la invención proporciona un método para la selección de proteínas de fusión del Fc mutante con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión del Fc mutante de unirse a FcR11A y/o FcR11A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcR11A y/o FcR11A. En otra realización, la invención proporciona un método para la selección de proteínas de fusión del Fc mutante con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión del Fc mutante de unirse a FcR11A y/o FcR11A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcR11A y/o FcR11A, y la capacidad adicional de la proteína de fusión del Fc mutante de unirse a FcR11B con una afinidad más baja que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcR11B. Se apreciará para una persona con experiencia en la técnica, que los métodos de la invención se pueden usar para la identificación y tamizaje de cualquiera de las mutaciones en las regiones Fc de las moléculas, con cualquier característica de unión deseada.

45 Las células de levaduras que presentan las proteínas de fusión del Fc mutante se pueden tamizar y caracterizar por cualquiera de los ensayos bioquímicos e inmunológicos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para la evaluación de las interacciones de unión.

50 Preferentemente, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas para aquellos con experiencia en la técnica, se usa para el tamizaje de las proteínas de fusión del Fc mutante presentes en la superficie de la célula de levadura para unir a FcR11A, preferentemente el complejo tetramérico FcR11A, u opcionalmente a FcR11B. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente un gran número de células individuales que contienen insertos de la genoteca (por ejemplo, 10-100 millones de células per hora) (Shapiro y otros, Practical Flow Cytometry, 1995). Además, parámetros específicos usados para la optimización incluyendo, pero sin limitarse a, concentración de ligando (es decir, complejo tetramérico FcR11A), tiempo de competencia cinética, o rigurosidad FACS se pueden variar para seleccionar las células que presentan las proteínas de fusión de Fc con propiedades de unión específica, por ejemplo, mayor afinidad por FcR11A en

comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar las células biológicas son bien conocidos en la técnica. Citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 4,347,935; 5,464,581; 5,483,469; 5,602,039; 5,643,796; y 6,211,477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson y Compañía, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las células de levadura se analizan mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En la mayoría de las realizaciones preferidas, los análisis por FACS de las células de levadura se hacen de forma iterativa, al menos dos, al menos tres veces, o al menos 5 veces. Entre cada ronda de selección de células se crecen de nuevo e inducen por lo que las regiones Fc se muestran en el número máximo de superficies de la célula de levadura. Aunque no se pretende estar limitado por un mecanismo de acciones, este proceso iterativo ayuda a enriquecer la población de células con un fenotipo en particular, por ejemplo, unión alta a FcγRIIIA.

En realizaciones preferidas, el tamizaje de Fc variantes de la invención comprende un proceso de selección que tiene múltiples rondas para tamizar, por ejemplo, al menos dos rondas para tamizar. En una realización, el tamizaje de Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIIA puede comprender las etapas siguientes: en la primera ronda para tamizar, una genoteca de las células de levadura, por ejemplo, una genoteca virgen de 10^7 las células se enriquecen por FACS, preferentemente de una forma iterativa, usando por ejemplo FcγRIIIA tetramérico marcado para seleccionar Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIIA; la región Fc variante que se selecciona con el fenotipo deseado, por ejemplo, la unión mejorada a FcγRIIIA, se introduce después dentro de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo manipulado genéticamente se ensaya usando un tamiz secundario, por ejemplo, ELISA para la unión a un FcγR. En la segunda ronda para tamizar, una genoteca de simple mutación se puede generar basado en el primer tamiz tal que la región Fc alberga la variante que presenta la afinidad mejorada por FcγRIIIA; y enriquecer por FACS usando por ejemplo, FcγRIIIA monomérico marcado tanto en la presencia como ausencia del receptor no-marcado; y la región Fc variante se introduce después dentro de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo manipulado genéticamente se ensaya usando un tamiz secundario, por ejemplo, ELISA para la unión a un FcγR. En algunas realizaciones, el tamiz secundario puede comprender además caracterizar los anticuerpos que comprenden Fc variantes en un ensayo basado en ADCC o BIAcore usando los métodos descritos en la presente.

La invención abarca el tamizaje por FACS de la genoteca de mutantes en levadura bajo condiciones de equilibrio o cinéticas. Cuando el tamizaje se realiza bajo condiciones de equilibrio, un exceso de la genoteca de levadura que porta Fc mutantes se incuba con FcγRIIIA, preferentemente FcγRIIIA marcado a una concentración 5 -10 veces más abajo de la Kd, durante al menos una hora para permitir la unión de Fc mutantes a FcγRIIIA bajo condiciones de equilibrio. Cuando el tamizaje se realiza bajo condiciones cinéticas, la genoteca de mutantes en levadura se incuba con FcγRIIIA marcada; las células se incuban después con FcγRIIIA equimolar no-marcado durante un tiempo pre-seleccionado, FcγRIIIA unido se monitorea después.

Un método ilustrativo para analizar las células de levadura que expresan las proteínas de fusión del Fc mutante con FACS se co-tiñen las células con el complejo tetramérico FcγRIIIA que se marcó con un marcador fluorescente tal como, PE y un anticuerpo anti-Fc, tal como F(ab)2 anti-Fc que se marcó con fluorescencia. Las medidas de fluorescencia de una genoteca de levadura producida de acuerdo con los métodos de la invención involucra preferentemente comparaciones con controles; por ejemplo, células de levadura que carecen de las moléculas que codifican inserto que comprenden una región Fc (control negativo). El clasificador de flujo tiene la capacidad no sólo de medir las señales de fluorescencia en las células a una tasa rápida, sino también de coleccionar las células que tienen propiedades fluorescentes específicas. Esta característica puede emplearse en una realización preferida de la invención para enriquecer la población inicial de la genoteca de células que expresan proteínas de fusión a Fc con características de unión específicas, por ejemplo, gran afinidad por FcγRIIIA en comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre. En una realización preferida de la invención, las células de levadura se analizan por FACS y las puertas de clasificación establecidas para seleccionar las células que muestran la más alta afinidad por FcγRIIIA en relación con la cantidad de la expresión de Fc en la superficie de la célula de levadura. De acuerdo con una realización preferida, cuatro clasificadores consecutivos se establecieron, en donde las puertas para cada clasificación sucesiva es 5.5 %, 1 %, 0.2 %, y 0.1 %. Se prefiere que la genoteca de presentación en levadura formada de acuerdo con los métodos de la invención se muestree por encima al menos 10^7 veces para mejorar la probabilidad de aislar clones raros (por ejemplo, analizar $\sim 10^8$ células de una genoteca de 10^7 clones). Alternativamente, 2-5 clasificaciones se establecen para seleccionar las células del fenotipo deseado. Las puertas de clasificación pueden establecerse empíricamente para una persona con experiencia en la técnica.

En otras realizaciones preferidas, las proteínas de fusión del Fc mutante mostradas en la superficie de la célula de levadura se tamizan usando ensayos basados en fase sólida, por ejemplo ensayos usando perlas magnéticas, por ejemplo, suministrados por Dynal, preferentemente un modo rápido de unión a un FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA. En

- una realización, los ensayos de perlas magnéticas se pueden usar para identificar mutantes con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o afinidad reducida por FcγRIIB. Un ensayo ilustrativo para identificar mutantes con afinidad mejorada por FcγRIIIA y afinidad reducida por FcγRIIB puede comprender la selección de mutantes mediante una reducción secuencial en fase sólida usando perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB seguido por la selección con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIIA. Por ejemplo un ensayo puede comprender las siguientes etapas: incubar la genoteca de las células de levadura generada de acuerdo con los métodos de la invención con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB; separar las células de levadura unidas a las perlas de la fracción no-unida colocando la mezcla en un campo magnético, eliminar las células de levadura no-unidas y colocarlas en un medio fresco; unir las células de levadura a perlas recubiertas con FcγRIIIA, separar las células de levadura unidas a las perlas de la fracción no-unida colocando la mezcla en un campo magnético, eliminar las células de levadura no-unidas; eliminar las células unidas mediante mezcla vigorosa; crecer las células recuperadas en medio que contiene glucosa; re-inducir en medio selectivo que contiene galactosa. El proceso de selección se repite al menos una vez. El dominio Fc que contiene los insertos se amplifican después usando metodologías comunes conocidas en la técnica, por ejemplo, PCR, e introducen dentro de un anticuerpo por métodos ya descritos para la caracterización adicional.
- 15 En una realización alternativa, un sistema de no-levadura se usa para caracterizar las propiedades de unión de las moléculas de la invención. Un sistema ilustrativo de caracterización de las moléculas de la invención comprende un vector de expresión de mamífero que contiene la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína 4-4-20, dentro del cual se clonan los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención con regiones Fc variantes. El clon recombinante resultante se expresa en una línea celular huésped de mamífero (es decir, línea celular de riñón humano 293H), y la inmunoglobulina recombinante resultante se analiza para la unión a FcγR usando cualquier ensayo estándar conocido para aquellos con experiencia en la técnica, que incluye pero sin limitarse a, ELISA y FACS.
- 20 Las moléculas de la presente invención (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas) se pueden caracterizar de maneras diversas. Particularmente, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc modificadas se pueden ensayar por la capacidad de unirse inmuno-específicamente a un ligando, por ejemplo, complejo tetramérico FcγRIIIA. Un ensayo de este tipo puede realizarse en solución (por ejemplo, Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992), en perlas (Lam, Nature, 354:82-84, 1991, en chips (Fodor, Nature, 364:555-556, 1993), en bacterias (patente de Estados Unidos núm. 5,223,409), en esporas (las patentes de Estados Unidos núms. 5,571,698; 5,403,484; y 5,223,409), en plásmidos (Cull y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869, 1992) o en fago (Scott y Smith, Science, 249:386-390, 1990; Devlin, Science, 249:404-406, 1990; Cwirla y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382, 1990; y Felici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991). Las moléculas que se han identificado para unirse inmuno-específicamente a un ligando, por ejemplo, FcγRIIIA se pueden ensayar después para su especificidad y afinidad por el ligando.
- 25 Las moléculas de la invención que se manipularon genéticamente para comprender regiones Fc modificadas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) o se identificaron con el sistema de presentación en levadura para tener el fenotipo deseado (véase sección 5.1) se pueden ensayar para la unión inmuno-específica a un antígeno (por ejemplo, antígeno de cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR) por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión inmuno-específica y la reactividad cruzada incluyen, pero sin limitarse a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de difusión en gel de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, para nombrar sólo unos pocos. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y otros, eds, 30 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).
- 35 La afinidad de unión de las moléculas de la presente invención que comprenden regiones Fc modificadas con un ligando, por ejemplo, complejo tetramérico FcγR y la tasa de interacción se pueden determinar con ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del ligando marcado, tal como FcγR tetramérico (por ejemplo, 3H o 125I) con una molécula de interés (por ejemplo, las moléculas de la presente invención que comprenden regiones Fc modificadas) en presencia de cantidades crecientes de ligando no-marcado, tal como FcγR tetramérico, y la detección de la molécula unida al ligando marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención por el ligando y las tasas de unión se pueden determinar a partir de los datos de saturación por análisis de dispersión.
- 40 En una realización preferida, el análisis cinético de BIAcore se usa para determinar la unión y tasas de las moléculas de la presente invención para un ligando tal como FcγR. El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un ligando a partir de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden regiones Fc modificadas) en su superficie.
- 45 50 55

5.2.6 Secuenciación de los mutantes

Cualquier variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica se pueden usar para secuenciar directamente las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen los basados en las técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:560, 1977) o Sanger (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977). Se contempla además que cualquier variedad de procedimientos de secuenciación automatizados se pueden utilizar (Bio/Techniques, 19:448, 1995), incluyendo la secuenciación por espectrometría de masa (véase, por ejemplo, publicación del PCT núm. WO 94/16101, Cohen y otros, Adv. Chromatogr., 36:127-162, 1996, y Griffin y otros, Appl. Biochem. Biotechnol., 38:147-159, 1993).

5.2.7 Ensayos funcionales de moléculas con regiones Fc variantes

La invención abarca la caracterización de las moléculas de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante identificado mediante la tecnología de presentación en levadura descrita anteriormente; o anticuerpos monoclonales terapéuticos manipulados genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención) usando ensayos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para la identificación de la función celular efectora de las moléculas. Particularmente, la invención abarca caracterizar las moléculas de la invención para la función celular efectora mediada por FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ensayarse de acuerdo con la descripción, incluyen, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización opsonofagocitosis, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Cualquier ensayo basado en células o sin células conocido por aquellos con experiencia en la técnica puede usarse para determinar la actividad funcional de células efectoras (para ensayos de células efectoras, véase Perussia y otros, 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini y otros, 1998 Experientia, 44(10): 841-8; Lehmann y otros, 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn y otros, 1990 J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid y otros, 2002 Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding y otros, 1998, Immunity 8:403-411).

En una realización, las moléculas de la invención se pueden ensayar para la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Alternativamente, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la invención se puede ensayar en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que se pueden obtener usando procedimientos estándar conocidos para aquellos con experiencia en la técnica (por ejemplo, véase Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la invención se caracteriza midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceínada mediante los métodos descritos anteriormente (Tridandapani y otros, 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ilustrativo para medir la fagocitosis de las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes con afinidades mejoradas para FcγRIIIA, comprende de: tratar las células THP-1 con una molécula de la invención o con un anticuerpo control que no se une a FcγRIIIA, comparar los niveles de actividad de dichas células, en donde una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, actividad de roseta (el número de SRBC recubiertas con IgG unidas a células THP-1), actividad de adherencia (el número de SRBC unidas a células THP-1), y tasa fagocítica) puede indicar la funcionalidad de la molécula de la invención. Se puede apreciar por una persona con experiencia en la técnica que este ensayo ilustrativo se puede usar para ensayar cualquiera de las moléculas identificadas por los métodos de la invención.

Otro ensayo ilustrativo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpo (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula objetivo tal como *Escherichia coli*-marcada con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 tipo silvestre, un anticuerpo con fluoresceína (véase Bedzyk y otros, 1989, J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que suprime la unión a FcγRIII, como un control de fondo para ADCP dependiente de FcγR (iii) anticuerpo 4-4-20 que porta regiones Fc variantes identificadas por los métodos de la invención y producidas como se ejemplifica en el ejemplo 6.6; y formar la partícula opsonizada; añadir cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) para células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible de la ATCC) en una relación 60:1 para permitir que ocurra la fagocitosis mediada por FcγR; preferentemente incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1.5 hora; añadir azul tripán después de la incubación (preferentemente a temperatura ambiente durante 2-3 minutos) a las células para detener la fluorescencia de la bacteria que se adhiere al exterior de la superficie celular sin ser internalizada; transferir las células en un tampón FACS (por ejemplo, 0.1 %, BSA en PBS, 0.1 %, ázida sódica), analizar la fluorescencia de las células THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferentemente, las células THP-1 usadas en el ensayo se analizan por FACS para la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto CD32A como CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea en la conducción del ensayo ADCP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 preferentemente se bloquean con 100 µg/ml de IgG1 soluble o suero humano al 10 %. Para analizar la

extensión de la ADCP, la puerta preferentemente se fija en las células THP-1 y se mide la media de la intensidad de la fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula e informa como un valor normalizado con el chMab 4-4-20 tipo silvestre obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a las células THP-1 tal que la relación de las partículas opsonizadas con las células THP-1 es 30:1 o 60:1. En la mayoría de las realizaciones preferidas, el ensayo ADCP se lleva a cabo con controles, tales como E. coli-FITC en medio, E. coli-FITC y células THP-1 (que sirve como actividad ADCP independiente de FcγR), E. coli-FITC, las células THP-1 y el anticuerpo 4-4-20 tipo silvestre (que sirve como actividad ADCP dependiente de FcγR), E coli-FITC, las células THP-1, 4-4-20 D265A (que sirve como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas de la invención se pueden ensayar por actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, células citolíticas naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos para aquellos con experiencia en la técnica (véase por ejemplo, Perussia y otros, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92). Un ensayo ilustrativo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende de: marcar las células objetivo con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula permeable en la membrana celular se usa comúnmente para marcar, ya que se une a las proteínas citoplasmáticas y aunque se libera espontáneamente de las células con cinética lenta, tras la necrosis de la célula objetivo se libera masivamente); opsonizar las células objetivo con las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes; combinar las células objetivo opsonizadas y radiomarcadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una relación adecuada de células objetivo a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; recoger sobrenadantes; y analizar la radioactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención se pueden determinar después, por ejemplo usando la siguiente fórmula: % lisis = (cpm experimental - cpm fuga objetivo)/(cpm lisis por detergente - cpm fuga objetivo) x 100 %. Alternativamente, % lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular usando la fórmula: lisis específica = % lisis con las moléculas de la invención - % lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Se puede generar un gráfico ya sea variando la relación de células objetivo:efectoras o la concentración del anticuerpo.

En aun otra realización, las moléculas de la invención se caracterizan por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) véase, por ejemplo, Ding y otros, *Immunity*, 1998, 8:403-11.

Preferentemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que, preferentemente, se purifican a partir de sangre humana normal, usando métodos estándar conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Células efectoras preferidas para su uso en los métodos de la invención expresan diferentes receptores de activación de FcγR. La invención abarca, células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan tanto FcγRIIA como FcγRIIB, para determinar si los mutantes del anticuerpo de Fc muestran actividad ADCC aumentada y fagocitosis en relación con anticuerpos IgG1 tipo silvestre.

La línea celular de monocito humano, THP-1, activa la fagocitosis a través de la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit y otros, 1991, *J. Leuk. Biol.* 49: 556). Las células THP-1 no expresan constitutivamente FcγRIIA ni FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas da lugar al patrón de expresión de FcR (Pricop y otros, 2000 *J. Immunol.* 166: 531-7). El crecimiento de las células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y causa una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB se puede mejorar también con el aumento de la densidad celular (Tridandapani y otros, 2002, *J. Biol Chem.* 277: 5082-9). A diferencia, se ha informado de que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIA (Pearse y otros, 1993 *PNAS USA* 90: 4314-8). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular se puede determinar por FACS usando métodos comunes conocidos para una persona con experiencia en la técnica. La expresión de FcγR inducida por citocina en la superficie celular proporciona un sistema para probar tanto la activación como la inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no son capaces de expresar el FcγRIIB la invención abarca además otra línea celular de monocitos humanos, U937. Estas células demostraron que diferencian terminal en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren y otros, 1979, *Nature* 279: 328-331).

La destrucción de la célula tumoral dependiente de FcγR está mediada por macrófago y células NK en los modelos tumorales de ratones (Clynes y otros, 1998, *PNAS USA* 95: 652-656). La invención abarca el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de Fc mutantes para inducir la citotoxicidad celular de las células objetivo tanto en fagocitosis como ensayos ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIA, y FcγRIIB están afectados por diferentes condiciones del crecimiento. La expresión de FcγR a partir de monocitos elutriados por congelación, monocitos elutriados frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10 %, y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y o en suero humano se pueden determinar usando métodos comunes conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden teñir con anticuerpos específicos a FcγR y analizar por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que mejor mimetizan la expresión de FcγR in vivo en macrófago se usa después para los métodos de la invención.

- En algunas realizaciones, la invención abarca el uso de células murinas especialmente cuando no son capaces de obtenerse las células humanas con los perfiles de FcγR correctos. En algunas realizaciones, la invención abarca la línea celular de macrófago murino RAW264.7(ATCC) que se puede transformar con FcγRIIIA humano y transfectantes estables aislados usando los métodos conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph y otros, J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes se pueden cuantificar para la expresión de FcγRIIIA por análisis FACS usando la experimentación de rutina y altos expresores se pueden usar en los ensayos ADCC de la invención. En otras realizaciones, la invención abarca el aislamiento del macrófago peritoneal de bazo que expresa FcγR humano a partir de ratones transgénicos knockout tales como los descritos en la presente.
- Linfocitos se pueden cosechar a partir de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población aislada de células mononucleares de la mayoría de la actividad ADCC se produce a través de las células citotóxicas naturales (NK) que contienen FcγRIIIA pero no FcγRIIB en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en la inducción ADCC de células NK y establecen los reactivos para probar con los monocitos elutriados.
- Las células objetivo usadas en los ensayos ADCC incluyen, pero sin limitarse a, líneas de células de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de acceso a la ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp y otros, 1976, Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitts, por ejemplo, células de Raji con número de acceso a ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein y otros, 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células Daudi con número de acceso a ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein y otros, 1968, Cancer Res. 28: 1300-10). Las células objetivo deben reconocerse por el sitio de unión al antígeno de la inmunoglobulina que se ensaya.
- El ensayo ADCC se basa en la capacidad de las células NK de mediar la muerte celular a través de una ruta apoptótica. Las células NK median la muerte celular, en parte, por el reconocimiento del FcγRIIIA de la IgG unida a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos ADCC usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser ensayos basados en radioactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar las células objetivo, por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, opsonizar las células objetivo con un anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular en la célula objetivo a través de su sitio de unión al antígeno; combinar las células objetivo marcadas y opsonizadas y las células efectoras en una relación adecuada, que se puede determinar con experimentación de rutina; cosechar las células; detectar el marcador en el sobrenadante de las células objetivo lisadas, usar un esquema de detección adecuado basado en el marcador usado. Las células objetivo se pueden marcar ya sea con un marcador radioactivo o un marcador fluorescente, usando los métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo los marcadores incluyen, pero sin limitarse a, $[^{51}\text{Cr}]\text{Na}_2\text{CrO}_4$; y el éster de acetoximetilo del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA).
- En una realización preferida específica, un ensayo fluorimétrico de tiempo resuelto se usa para medir la actividad ADCC contra las células objetivo que se marcaron con el éster de acetoximetilo del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA). Tales ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg y otros, 1996, Journal of Immunological Methods, 193: 199-206. En resumen, las células objetivo se marcan con el diéster de acetoximetilo de TDA permeable a la membrana (bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato, (BATDA), que se difunde rápidamente a través de la membrana celular de las células viables. Esterasas intracelulares separan los grupos éster y la molécula de TDA impermeable a la membrana regenerada queda atrapado dentro de la célula. Después de la incubación de las células efectoras y objetivo, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3.5 horas, a 37°C, bajo 5 % CO₂, el TDA liberado de las células objetivo lisadas está quelado con Eu³⁺ y la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro tiempo resuelto (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac).
- En otra realización específica, el ensayo ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende las etapas siguientes: preferentemente 4-5x10⁶ células objetivo (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) se marcan con bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-t-6"-dicarboxilato (DELFIA BATDA Reagent, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficiencia óptima del marcaje, el número de células objetivo usadas en el ensayo ADCC preferentemente no deben exceder 5x10⁶. El reactivo BATDA se añade a las células y la mezcla se incuba a 37°C preferentemente bajo 5 % CO₂, durante al menos 30 minutos. Las células se lavan después con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con 0.125 mM de sulfipirazol, y medio que contiene 0.125 mM de sulfipirazol. Las células objetivo marcadas se opsonizan después (recubiertas) con una molécula de la invención que comprende una región Fc variante, es decir, una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multi-específico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo ADCC es específica para un receptor de la superficie celular, un antígeno de tumor, o un antígeno de cáncer. La

inmunoglobulina en la que una región Fc variante de la invención se introduce puede unirse específicamente a cualquier antígeno de cáncer o tumor, tales como los enumerados en la sección 5.4. Además, la inmunoglobulina en la que una región Fc variante de la invención se introduce puede ser cualquier anticuerpo terapéutico específico para un antígeno de cáncer, tales como los enumerados en la sección 5.4. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo ADCC es un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz y otros, 1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995) un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico ratón-humano 2H7 (Liu y otros, 1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6); o un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (p185 HER2) (Carter y otros. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9). Las células objetivo en el ensayo ADCC se eligen de acuerdo con la inmunoglobulina en la que una región Fc variante de la invención se introdujo tal que la inmunoglobulina se une específicamente a un receptor de la superficie celular de la célula objetivo. Preferentemente, los ensayos ADCC de la invención se realizan usando más de un anticuerpo manipulado genéticamente, por ejemplo, anti Her2/neu, 4-4-20, 2B6, Rituxan, y 2H7, que albergan las Fc variantes de la invención. En una realización más preferida, las Fc variantes de la invención se introducen en al menos 3 anticuerpos y se prueban sus actividades ADCC. Aunque no se pretende estar limitado por un mecanismo de acción, examinar al menos 3 anticuerpos en estos ensayos funcionales disminuirá la probabilidad de eliminar erróneamente una mutación de Fc viable.

Las células objetivo opsonizadas se añaden a las células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir relaciones efectora:objetivo de aproximadamente 50:1, 75:1, o 100:1. En una realización específica, cuando la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante tiene el dominio variable de 4-4-20, la relación efectora:objetivo es 75:1. Las células efectoras y objetivo se incuban durante al menos dos horas, hasta 3.5 horas, a 37 °C, bajo 5 % CO₂. Los sobrenadantes celulares se recogen y añaden a una solución ácida de europio (por ejemplo, DELFIA Europium Solution, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro de tiempo resuelto (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y liberación espontánea (SR) se determinan mediante la incubación de las células objetivo con TX-100 al 1 % y medio sólo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente del anticuerpo (AICC) se mide mediante la incubación de las células objetivo y efectoras en ausencia de anticuerpo. Cada ensayo preferentemente se realiza por triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como:

$$\text{Liberación experimental (ADCC) - AICC} / (\text{MR} - \text{SR}) \times 100.$$

La invención abarca la caracterización de Fc variantes tanto en ensayos ADCC dependientes de NK como dependientes de macrófago. Fc variantes de la invención tienen fenotipos alterados tal como una función efectora alterada como ensayada en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófago.

La invención abarca ensayos conocidos en la técnica y que se ejemplifican en la presente descripción, para unir C1q y mediar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para determinar la unión de C1q, un ELISA de unión a C1q puede realizarse. Un ensayo ilustrativo puede comprender lo siguiente: placas de ensayo se pueden recubrir toda la noche a 4°C con el polipéptido variante o polipéptido inicial (control) en tampón de recubrimiento. Las placas se pueden lavar y bloquear después. Después de lavar, una alícuota de C1q humano se puede añadir a cada pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, 100 µL de un anticuerpo de oveja anti-complemento C1q conjugado con peroxidasa se puede añadir a cada pocillo e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa puede lavarse de nuevo con tampón de lavado y 100 µL de tampón de sustrato que contiene OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma)) se puede añadir a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse transcurrir durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 µL de 4.5 NH₂ SO₄. La absorbancia se puede leer después a (492-405) nm.

Una variante preferida de acuerdo con la invención es una que muestra una reducción significativa en la unión de C1q, como se detecta y se mide en este ensayo o un ensayo similar. Preferentemente la molécula que comprende un Fc variante presenta reducción de aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 80 veces, o reducción de aproximadamente 90 veces en la unión de C1q en comparación con un anticuerpo control que tiene una región Fc de IgG1 no-mutada. En la realización más preferida, la molécula que comprende un Fc variante no se une C1q, es decir la variante muestra aproximadamente 100 veces o más reducción en la unión de C1q en comparación con el anticuerpo control.

Otra variante ilustrativa es una que tiene una mejor afinidad de unión por C1q humana que la molécula que comprende la región Fc tipo silvestre. Una molécula de este tipo puede presentar, por ejemplo, aproximadamente dos veces o más, y preferentemente aproximadamente cinco veces o más, mejoría en la unión de C1q humano en comparación con la molécula parental que comprende la región Fc tipo silvestre. Por ejemplo, la unión de C1q humano puede ser aproximadamente dos veces a aproximadamente 500 veces, y preferentemente de aproximadamente dos veces o de aproximadamente cinco veces a aproximadamente 1000 veces mejorada en comparación con la molécula que comprende región Fc tipo silvestre.

Para evaluar la activación del complemento, un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) puede realizarse, por ejemplo, como es descrito en Gazzano-Santoro y otros, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). En resumen, varias concentraciones de la molécula que comprende una región Fc variante el complemento humano pueden diluirse con tampón. Las células que expresan el antígeno al cual se une la molécula que comprende una región Fc variante puede diluirse a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Mezclas de la molécula que comprende una región Fc variante, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno se pueden añadir a una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos fondo plano y dejan incubarse durante 2 horas a 37°C y 5 % CO_2 para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. 50 μL de azul de alamar (Accumed International) pueden añadirse después en cada pocillo e incubarse durante la noche a 37°C . La absorbancia se mide usando un fluorímetro de 96-pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados se pueden expresar en unidades de fluorescencia relativas (RFU). Las concentraciones de la muestra pueden calcularse a partir de una curva estándar y el por ciento de actividad en comparación con molécula no variante, es decir, una molécula que comprende la región Fc tipo silvestre, se reporta para la variante de interés.

En algunas realizaciones, un Fc variante de la invención no activa el complemento preferentemente la variante no parece tener cualquier actividad CDC en el ensayo anterior de CDC. La invención se refiere además a una variante con CDC mejorada en comparación con una molécula parental (una molécula que comprende la región Fc tipo silvestre), por ejemplo, que muestra aproximadamente dos veces a aproximadamente 100 veces mejoría en la actividad CDC *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en los valores de IC_{50} para cada molécula que se compara). Los ensayos de complemento pueden realizarse con suero de conejillo de indias, conejo o ser humano. La lisis de las células objetivo por el complemento puede detectarse monitoreando la liberación de enzimas intracelulares tal como lactato deshidrogenasa (LDH), como descrito en Korzeniewski y otros, 1983 *Immunol. Methods* 64(3): 313-20; y Decker y otros, 1988 *J. Immunol Methods* 115(1): 61-9; o la liberación de un marcador intracelular tales como europio, cromo 51 o indio 111 cuyas células objetivo se marcan como se describe en la presente.

5.2.8 Otros ensayos

Las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes se pueden ensayar además usando cualquiera de los ensayos basados en resonancia de plasmón superficial conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la unión de interacción de Fc-Fc γ R. Cualquier instrumento SPR disponible en el comercio, que incluyen, pero sin limitarse a, Instrumentos BIAcore, disponible de Biacore AB (Uppsala, Suecia), instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); sistema IBIS disponibles de Windsor Scientific Limited, (Berks, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y Detector SPR Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, Texas) se pueden usar en la presente invención. Para una revisión de la tecnología basada en SPR véase Mullet y otros, 2000, *Methods* 22: 77-91; Dong y otros, 2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303-23; Fivash y otros, 1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101; Rich y otros, 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61 Además, cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína que se describen en patente de los Estados Unidos núm. 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; 6,268,125 se contemplan en los métodos de la invención

En resumen, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro del par de unión sobre una superficie, y controlar en tiempo real su interacción con el otro miembro del par de unión en solución. SPR se basa en la medición del cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip del sensor, que está en el corazón de la tecnología SPR; este consiste en una superficie de vidrio revestida con una capa delgada de oro y forma la base para una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de la molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores están disponibles en el comercio especialmente de compañías mencionadas arriba, los que se pueden usar en los métodos de la invención. Los ejemplos de chips sensores incluyen aquellos disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Sensor Chip CM5, SA, NTA, y HPA. Una molécula de la invención se puede inmovilizar sobre la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos de inmovilización y composiciones químicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, unión de la biotina a la superficie revestida con avidina acoplamiento aldehído a grupos carbohidratos, y unión a través de la etiqueta de histidina con chips de NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de moléculas de la invención que comprende regiones Fc variante, por ejemplo, inmunoglobulinas que comprende región Fc variante, a un Fc γ R se puede determinar usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Cualquier Fc γ R se puede usar para evaluar la interacción con las moléculas de la invención que comprende las regiones Fc variantes. En una realización específica el Fc γ R es Fc γ RIIIA, preferentemente un Fc γ RIIIA monomérico y soluble. Por ejemplo, en una realización, el Fc γ RIIIA monomérico soluble es la región extracelular de la secuencia

de FcγRIIIA unida al enlazador-AVITAG (véase, solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/439,498, presentada el 9 de enero, 2003 (expediente judicial núm. 11183-004-888) y la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/456,041 presentada el 19 de marzo, 2003). En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, preferentemente un FcγRIIB dimérico soluble. Por ejemplo en una realización, la proteína FcγRIIB dimérica soluble se prepara de acuerdo con la metodología descrita en solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/439,709 presentada el 13 de enero, 2003.

Un ensayo ilustrativo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende una región Fc variante, en donde la molécula es el anticuerpo 4-4-20, a un FcγR usando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: BSA-FITC se inmoviliza en una de las cuatro celdas de flujo de una superficie del chip sensor, preferentemente a través de química de acoplamiento de amina de manera que aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) de BSA-FITC está inmovilizada en la superficie. Una vez que se prepara una superficie adecuada, los anticuerpos 4-4-20 que portan las mutaciones de Fc se pasan sobre la superficie, preferentemente mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 µg/ml a un régimen de flujo de 5 µL/ml. El nivel de anticuerpos 4-4-20 unido a la superficie se encuentra en el intervalo entre 400 y 700 RU. A continuación, serie de dilución del receptor (proteína de fusión FcγRIIB-Fc) en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5) se inyectó en la superficie a 100 µL/min la regeneración del anticuerpo entre diferentes diluciones del receptor se lleva a cabo preferentemente con inyecciones simples de 5 segundos de NaHCO₃ 100mM, pH 9.4; NaCl 3M. Cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica está contemplada en el método de la invención.

Una vez que se recoge un conjunto de datos completos, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente usando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante del instrumento SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto Kon como Koff, a partir de los cuales la constante del equilibrio de unión aparente, Kd se deduce como la relación de las dos constantes de velocidad (es decir, Koff/Kon). Tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales se pueden encontrar en el Manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados se puede hacer usando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los varios métodos de interpretación de los datos cinéticos generados véase Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher y otros, 1994, Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken y otros, 1992, Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton y otros, 1995, Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy y otros, 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83

En realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis SPR, por ejemplo, BIAcore, se pueden usar como una medida predictiva de cómo una molécula de la invención funcionará en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método ilustrativo para la predicción de la eficacia de una molécula de la invención basado en parámetros cinéticos obtenidos de un análisis SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de Koff para la unión de una molécula de la invención a FcγRIIIA y FcγRIIB; representar (1) Koff(wt)/Koff (mut) para FcγRIIIA; (2) Koff (mut)/Koff (wt) para FcγRIIB contra los datos de ADCC. Números mayores que uno muestran una disminución de la tasa de disociación para FcγRIIIA y un aumento de la tasa de disociación para FcγRIIB en relación con tipo silvestre; y poseen una función ADCC mejorada.

5.3 Métodos para producir moléculas de la invención de manera recombinante

5.3.1 Polinucleótidos que codifican moléculas de la invención

La presente invención incluye polinucleótidos que codifican las moléculas, que incluyen las polipéptidos y anticuerpos, de la invención identificados por los métodos de la invención. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, por cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos de las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que se identifican por los métodos de la invención, la secuencia de nucleótidos puede manipularse cuando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. (Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y otros, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ra. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel y otros, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, cuando los ácidos nucleicos codifican anticuerpos, una o más de las CDR se insertan dentro de las regiones marco usando técnicas de rutina de ADN recombinante. Las regiones marco pueden ser de origen natural o regiones marco consenso y preferentemente regiones marco humano (véase, por ejemplo, Chothia y otros, 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para una lista de las regiones marco humana).

En otra realización, las genotecas humanas o cualquiera de las otras genotecas disponibles en la técnica, se pueden tamizar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

5.3.2 Expresión recombinante de moléculas de la invención

5 Una vez que la secuencia del ácido nucleico que codifica las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos) se han obtenido, el vector para la producción de las moléculas puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Los métodos que son bien conocidos por los expertos con experiencia en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación para las moléculas de la invención y señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos
10 incluyen, por ejemplo, in vitro técnicas de ADN recombinante, técnicas sintéticas, y recombinación genética in vivo. (Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y otros, 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2da Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y otros eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

15 Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada por los métodos de la invención (es decir, un anticuerpo) puede transferirse a una célula hospedera por técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir las moléculas de la invención. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la invención se regula con un promotor constitutivo, uno inducible o uno específico de tejido.

20 Las células huésped usadas para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula completa de inmunoglobulina recombinante. En particular, las células de mamífero tal como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento intermedio principal del promotor génico temprano del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas
25 (Foecking y otros, 1998, *Gene* 45:101; Cockett y otros, 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Una variedad de sistemas de vector de expresión puede utilizarse para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención. Tales sistemas de expresión-huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de las moléculas de la invención se pueden producir y posteriormente purificar, pero representan además las células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes del nucleótido adecuado, expresar las moléculas de la invención in situ. Estos incluyen, pero sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión recombinante de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias que codifican para las moléculas identificadas por los métodos de la invención; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión recombinante en levadura que contienen secuencias que codifican
30 las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican de las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, virus mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformado con vectores de expresión recombinante de plásmido (por ejemplo, plásmidoTi) que contienen
35 secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos de la invención; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase U.S. 5,807,715), células Per C.6 (células de retina humana desarrolladas por Crucell) constructos que albergan la expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K del
40 virus vaccinia).
45

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede ventajosamente seleccionarse dependiendo del uso previsto para la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de una proteína de este tipo que se produce, por la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente.
50 Tales vectores incluyen, pero sin limitarse a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y otros, 1983, *EMBO J.* 2:1791), en el cual la secuencia que codifica el anticuerpo se puede ligar individualmente dentro del vector en marco con la región codificante lac Z tal que una proteína de fusión se produce; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); vectores pGEX se pueden usar además para expresar polipéptidos foráneos como las proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Generalmente, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de
55 células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido por la elución en presencia

de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión para trombina o proteasa factor Xa tal que el producto génico objetivo clonado puede liberarse de la porción GST.

5 En un sistema de insecto, *Autographa californica* el virus de la poliedrosis nuclear (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no-esenciales (por ejemplo, el gen poliedrina) del virus ponerse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

10 En células huésped de mamíferos, se pueden utilizar una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Las señales de iniciación específicas pueden ser necesarias además para la traducción eficaz de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto entero. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden proceder de una variedad de orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de transcripción, etc. (véase Bittner y otros, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

25 Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína exógena expresada. Para esta finalidad, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Estas células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitarse a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

35 Para la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden genéticamente manipularse las líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de la invención. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral, las células huésped pueden transformarse con el ADN controlado mediante elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción etc. sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. A continuación de la introducción del ADN exógeno, se pueden dejar crecer las células genéticamente manipuladas durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar el plásmido de forma estable dentro de sus cromosomas y crecer para formar focos, que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse favorablemente para manipular genéticamente las líneas celulares que expresan los anticuerpos de la invención. Estas líneas celulares genéticamente manipuladas pueden ser particularmente útiles en el tamizaje y evaluación de los compuestos que interaccionan directamente o indirectamente con los anticuerpos de la invención.

45 Pueden usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler y otros, 1977, Cell 11: 223), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202), y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y otros, 1980, Cell 22: 817) pueden emplearse en las células tk, hgprt, o aprt respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y otros, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare y otros, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de ingeniería genética pueden usarse como se describe en Ausubel y otros. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y otros. (eds), 1994,

Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin y otros, 1981, J. Mol. Biol. 150:1; e higró, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y otros, 1984, Gene 30:147).

5 Los niveles de expresión de un anticuerpo de la invención pueden incrementarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando es amplificable un marcador del sistema vector que expresa un anticuerpo, el incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo se incrementará también (Crouse y otros, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

10 La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, lo cual permite la expresión similar de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un único vector se puede usar, que codifica los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxico (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

20 Una vez que una molécula de la invención (es decir, anticuerpos) se expresó de forma recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos o anticuerpos, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad del antígeno específico después de proteína A y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de polipéptidos o anticuerpos.

5.4 Métodos profilácticos y terapéuticos

25 La presente invención abarca administrar una o más moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos) a un animal, preferentemente un mamífero, y con la máxima preferencia un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno donde se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR. Los métodos y composiciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de la enfermedad neoplásica primaria o metastática (es decir, cáncer), y enfermedades infecciosas. Las moléculas de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como son conocidos en la técnica o como se describe en la presente. Como se detalla más abajo, las moléculas de la invención se pueden usar en los métodos para tratar o prevenir el cáncer (particularmente en la inmunoterapia pasiva), enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas.

35 Las moléculas de la invención se pueden utilizar de manera ventajosa en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de un cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas de la invención se pueden usar en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas, o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 y IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o actividad de las células efectoras que interactúan con las moléculas y, aumentan la respuesta inmune. Las moléculas de la invención ventajosamente pueden usarse además en conjunto con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección, tales como, por ejemplo, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, o agentes antivíricos, por ejemplo, como se detalla en las secciones, 5.4.1.2 y 5.4.2.1 más abajo.

5.4.1 Cánceres

45 La invención abarca composiciones para el tratamiento o prevención del cáncer o metastásis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden una región Fc variante.

50 Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes se pueden usar para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o metastásis de células cancerosas. En una realización, la molécula de la invención comprende un Fc variante que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas se pueden usar solas para tratar o prevenir el cáncer. En otra

realización, la molécula de la invención comprende una región Fc variante que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIIA, y además se une a FcγRIIB y/o FcγRIIA con una afinidad más baja que un polipéptido comparable que comprende una región Fc tipo silvestre que se une a FcγRIIB, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas se pueden usar solas para tratar o prevenir el cáncer.

En algunas realizaciones, la invención abarca composiciones para el tratamiento o prevención de cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR tales como los homocigotos de los alelos de FcγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. En algunas realizaciones, la invención abarca manipular genéticamente anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor de acuerdo con los métodos de la invención de manera que los anticuerpos manipulados genéticamente tienen eficacia mejorada en pacientes homocigotos para el alelo de baja afinidad de FcγRIIIA (158F). En otras realizaciones, la invención abarca manipular genéticamente anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor de acuerdo con los métodos de la invención de manera que los anticuerpos manipulados genéticamente tienen eficacia mejorada en pacientes homocigotos para el alelo de alta afinidad de FcγRIIIA (158V).

En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados genéticamente de la invención son particularmente eficaces en el tratamiento y/o prevención del linfoma no-Hodgkin (NHL). Los anticuerpos manipulados genéticamente de la invención son terapéuticamente más eficaces que los regímenes terapéuticos actuales para NHL, que incluye pero sin limitarse a, quimioterapia, e inmunoterapia usando mAb anti-CD20, Rituximab. La eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 depende sin embargo del polimorfismo de FcγR del sujeto (Carton y otros, 2002 Blood, 99: 754-8; Weng y otros, 2003 J Clin Oncol.21(21):3940-7). Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras y median ADCC. Alelos de alta afinidad, de los receptores de activación de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar ADCC. Los métodos de la invención permiten manipular genéticamente anticuerpos anti-CD20 que albergan mutaciones de Fc para mejorar su afinidad a FcγR en las células efectoras a través de sus dominios Fc alterados. Los anticuerpos manipulados genéticamente de la invención proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes, independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Un método ilustrativo para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-CD20 manipulados genéticamente en un sujeto puede incluir lo siguiente: plásmidos que albergan genes quiméricos de cadena pesada anti-HER2/neu con mutaciones de Fc que muestran la destrucción sustancialmente aumentada en ADCC pueden usarse como una cadena principal para transferir en el dominio variable del gen de cadena pesada de Rituximab. La región variable de la Fc variante de anti-HER2/neu se sustituye con la región variable de Rituximab. Los plásmidos que contienen dominios Fc tipo silvestre o una mutación D265A para anular la unión a FcR, o las Fc variantes de anti-CD20 se cotransfectan transitoriamente con el gen de la cadena ligera de Rituximab en las células 293H, condicionan los medios y el anticuerpo se purifica sobre una columna de proteína G usando métodos rutinarios.

Los mAbs anti-CD20 que albergan las Fc variantes se prueban por ADCC usando una línea de células B cultivadas para determinar la capacidad de las mutaciones Fc que mejoran ADCC. La ADCC estándar se realiza usando métodos descritos en la presente. Los linfocitos se cosechan de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células Daudi objetivo, una línea de células B que expresa CD20, se cargan con Europio (PerkinElmer) e incuban con efectoras durante 4 horas a 37°C. El europio liberado se detecta usando un lector de placa fluorescente (Wallac). Los datos resultantes de ADCC indican la eficacia de las Fc variantes para desencadenar la citotoxicidad mediada por las células NK y establecer que las Fc variantes anti-CD20 se pueden probar tanto con muestras de pacientes como con monocitos elutriados. Las Fc variantes que muestran el mayor potencial para mejorar la eficacia del anticuerpo anti-CD20 se prueban después en un ensayo de ADCC usando PBMCs de pacientes. Las PBMC de donantes sanos se usan como células efectoras. Los ensayos de ADCC in vitro usando variantes anti-CD20 y Rituximab se realizan en células de linfoma primario de pacientes con linfoma folicular. Se determina el polimorfismo específico de FcγR de los donantes y cataloga usando métodos conocidos en la técnica. El ensayo de ADCC se realiza por células efectoras de pacientes con diferentes genotipos de FcγRIIIA y/o FcγRIIA.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) de la invención que comprenden regiones Fc variantes mejoran la eficacia de la inmunoterapia del cáncer aumentando la potencia de la función efectora del anticuerpo en relación con una molécula que contiene la región Fc tipo silvestre, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. En una realización específica, la toxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o fagocitosis de las células tumorales se mejora usando las moléculas de la invención con regiones Fc variantes. Las moléculas de la invención pueden mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer con inmunoterapia al mejorar al menos una función efectora mediada por anticuerpo. En una realización particular, una molécula de la invención que comprende una región Fc variante, mejora la eficacia del tratamiento con inmunoterapia al mejorar la

5 cascada dependiente del complemento. En otra realización de la invención, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento con inmunoterapia al mejorar la fagocitosis y/u opsonización de las células tumorales específicas. En otra realización de la invención, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento al mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales específicas.

10 La invención contempla además manipular genéticamente anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos al tumor) para mejorar la eficacia terapéutica del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, al mejorar la función efectora del anticuerpo terapéutico (por ejemplo, ADCC). Preferentemente el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo citotóxico y/o opsonizante. Se apreciará por un experto en la técnica, que una vez que
 15 las moléculas de la invención con propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácidos, cuya modificación mejora la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc tipo silvestre) se han identificado (véase sección 5.2 y Tabla 8) de acuerdo con los métodos de la invención, los anticuerpos terapéuticos pueden ser manipulados genéticamente usando técnicas estándar de ADN recombinante y cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocida, como se describe en la sección 5.2.2 para producir terapéutico
 20 manipulado genéticamente que porta los sitios de mutación identificados con las propiedades de unión deseadas. Cualquiera de los anticuerpos terapéuticos enumerados en la Tabla 9 que tienen utilidad terapéutica demostrada en el tratamiento del cáncer, puede ser manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención, por ejemplo, modificando la región Fc para tener una afinidad mejorada por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA en comparación
 25 con un anticuerpo terapéutico que tiene una región Fc tipo silvestre, y usarse para el tratamiento o prevención de un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer. Otros anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos contra agentes patogénicos tales como aquellos contra *Streptococcus pneumoniae* Serotipo 6B, véase, por ejemplo, Sun y otros, 1999, *Infection and Immunity*, 67(3): 1172-9.

25 Los Fc variantes de la invención se pueden incorporar en los anticuerpos terapéuticos tales como los descritos en la presente descripción u otros candidatos clínicos de Fc fusión, es decir, una molécula que comprende unas regiones Fc que se aprobó por Estados Unidos en ensayos clínicos o cualquier otra molécula que puede beneficiarse de las Fc variantes de la presente invención, versiones humanizadas, afinidad madura, modificadas o manipuladas genéticamente de estas.

30 La invención abarca además manipular genéticamente cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc que tiene utilidad terapéutica, que incluye pero sin limitarse a, ENBREL, de acuerdo con los métodos de la invención, para mejorar la eficacia terapéutica de tales polipéptidos, por ejemplo, mejorando la función efectora del polipéptido que comprende una región Fc.

TABLA 9 ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS QUE PUEDEN MANIPULARSE GENÉTICAMENTE DE ACUERDO CON LOS MÉTODOS DE LA INVENCION

Compañía	Producto	Enfermedad	DIANA
Abgenix AltaRex	ABX-EGF BravaRex	OvaRex Cánceres metastásicos de cáncer de ovario	antígeno tumoral del receptor EGF CA125 antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomabytrium-90) Therex	cáncer de ovario cáncer de mama	antígeno PEM antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	bivatuzumab	cáncer cabeza & cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	accidente cerebro vascular isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAb, idiopático 105AD7	vacuna del cáncer colorrectal	gp72
CruceCell	Anti-EpCAM	Cáncer	Ep-CAM
Citoclonal	MAB, cáncer de pulmón	célula no pequeña	NA
		cáncer de pulmón	
Genentech	Herceptin	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptin	cáncer de mama estadio temprano	HER-2
	Rituxan	NHL recidiva/resistente o de bajo grado o folicular	CD20
	Rituxan	NHL intermedio & de alto grado	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	MAB-VEGF	cáncer colorrectal metastásico	VEGF
	Fab AMD	Degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26 (2 ^o gen. IgE)	asma alérgica & rinitis	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	NHL de células B, de bajo grado o folicular, en recidiva o refractario, positivo a CD-20 y NHL refractario a Rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecan	carcinoma refractario colorrectal	receptor EGF
	Cetuximab + cisplatino & radiación	cáncer de cabeza & cuello diagnosticado recientemente o recurrente	receptor EGF
	Cetuximab + gemcitabina	carcinoma pancreático metastásico diagnosticado	receptor EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza & cuello metastásico o recurrente	receptor EGF
	Cetuximab + carboplatin + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas diagnosticado recientemente	receptor EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza & cuello (enfermedad regional extensiva incurable local & metástasis distante)	receptor EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza & cuello localmente avanzado	receptor EGF
	BEC2 + Bacilo Calmette Guerin	carcinoma de pulmón de célula pequeña	imita gangliósido GD3
	BEC2 + Bacilo Calmette Guerin IMC-1C11	cáncer melanoma colorrectal con metástasis de hígado	receptor que imita al gangliósido GD3 VEGF

ImmonoGen	nuC242-DM1	cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	linfoma no-Hodgkins	CD22
	LymphoCide Y-90	linfoma no-Hodgkins	CD22
	CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arctumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagenología)	CEA
	CEA-Scan (arctumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de mama (radioimagenología)	CEA
	CEA-Scan (arctumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagenología)	CEA
	CEA-Scan (arctumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (radioimagenología)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección e tejido blando (radioimagenología)	CEA
	LymphoScan (marcado con T-99m)	linfomas (radioimagenología)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres hepáticos de célula germinal 7 (radioimagenología)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer cabeza & cuello	NA
	HumaSPECT	imagenología colorrectal	NA
Medarex	MDM-101 (CTLA-4)	próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (overexpresión de her-2)	cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha\beta 3$
Merck KGaA	MAb 425	diversos cánceres	receptor EGF
	IS-IL-2	diversos cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfática crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	linfoma no-Hodgkins	CD20
	Avidicina (albúmina NRLU13)	cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	linfoma no-Hodgkins	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno no-extirpable	proteínas asociadas a ADN

Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina de estafilococo)	cáncer pancreático	NA
	MAB, cáncer de pulmón/riñón	cáncer de pulmón & riñón	NA
	naclómab tafenatox (C242 + enterotoxina de estafilococo)	cáncer de colon & pancreático	NA
Protein Design Labs	Nuvion	Tumores malignos de células	CD3
	SMART M195	Aml	CD33
	SMART 1D10	NHL	antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico&	gangliósido GD2
		cáncer de pulmón de células pequeñas	
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metástasico & cáncer de pulmón de célula pequeña	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAB-G2 radiomarcado	linfoma no-Hodgkins	NA
	Monopham C	carcinoma colorrectal & pancreático	antígeno SK-1
	GlioMAB-H (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma & neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL recidiva/resistente o de bajo grado o folicular	CD20
	Rituxan	NHL intermedio & de alto grado	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

- 5 Como consecuencia, la invención proporciona métodos para prevenir o tratar cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, usando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico y se modificó en uno o más sitios en la región Fc, de acuerdo con la invención, para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad más alta que el anticuerpo terapéutico raíz, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) más eficazmente. En otra realización, la invención proporciona moléculas para uso en métodos para prevenir o tratar
- 10 cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, usando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico, y se manipuló genéticamente de acuerdo con la invención para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad más alta y unirse a FcγRIIB con una afinidad más baja que el anticuerpo terapéutico raíz, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) más eficazmente. Los anticuerpos terapéuticos que se manipularon genéticamente de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, ya que tienen una actividad citotóxica mejorada (por ejemplo, destrucción mejorada de las células tumorales y/o mejora, por ejemplo, la actividad ADCC o actividad CDC).
- 15 Los cánceres asociados con un antígeno de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un anticuerpo terapéutico que se une un antígeno de cáncer y es citotóxico, y se manipularon genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención para tener, por ejemplo, una función efectora mejorada. En una realización particular, los anticuerpos terapéuticos manipulados genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención mejoran el efecto citotóxico mediado por el anticuerpo del anticuerpo dirigido al antígeno de cáncer particular. Por
- 20 ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los antígenos de cáncer siguientes pueden tratarse o evitarse con las composiciones de la invención: antígeno de pancarcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415), antígeno de carcinoma ovárico (CA125) (Yu y otros, 1991, Cancer Res. 51 (2):48-475), fosfato ácido prostático (Tailor y otros., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1):4928), antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli y otros, 1993, Cancer Res. 53:227-230), antígeno asociado con melanoma p97 (Estin y otros, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-44), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl y otros., 1990, J. Exp. Med 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali y otros., 1987, Cancer 59:55-3; Mittelman y otros., 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon y otros, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294), antígeno de la mucina epitelial polimórfica, antígeno
- 25

globular de la grasa de la leche humana, antígenos asociados al tumor colorrectal, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata y otros, 1992, *Cancer Res.* 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar y otros, 1993, *Int. J. Cancer* 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn y otros, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie y otros, 1994, *Blood* 83:1329-1336), antígeno del linfoma-B humano CD20 (Reff y otros, 1994, *Blood* 83:435-445), CD33 (Sgouros y otros, 1993, *J. Nucl. Med.* 34:422-430), antígenos específicos de melanoma, tales como gangliósido GD2 (Saleh y otros, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y otros, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston y otros, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y otros, 1993, *Cancer Res.* 53:5244-5250), antígeno de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo antígeno T de virus tumoral de ADN y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom y otros, 1985, *Cancer Res.* 45:2210-2188), antígenos de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom y otros, 1986, *Cancer Res.* 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee y otros., 1988, *J of Immun.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens y otros, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17:359), antígeno de linfocito humano maligno APO-1 (Bernhard y otros, 1989, *Science* 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314:53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos y el endodermo primario fetal, I (Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39, que se encuentran en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 que se encuentran en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14, que se encuentran en adenocarcinoma de colon, F3, que se encuentra en adenocarcinoma pulmonar, AH6, que se encuentra en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley que se encuentra en células de carcinoma embrionarias, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF, que se encuentran en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) que se encuentran en cáncer pancreático, FC10.2, que se encuentra en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) que se encuentra en adenocarcinoma, NS-10, que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49, receptor EGF, (grupo sanguíneo ALeb/LeY) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, 19.9, que se encuentra en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T5A7 que se encuentra en las células mieloides, R24 que se encuentra en el melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, M1:22:25:8 que se encuentra en las células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4, que se encuentran en embriones en la etapa celular 4-8. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T a partir de un linfoma cutáneo de células T (véase Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o evitarse mediante las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, los siguientes: leucemias incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemia mieloblástica promielocítica, mielomonocítica, monocítica eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero sin limitarse a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica leucemia de célula pilosa; policitemia vera; linfoma tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples, tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple ardiente, mieloma de secreción intermitente, mieloma osteoesclerótico, leucemia de célula plasmática plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado incierto; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseo y del tejido conjuntivo tales como, pero sin limitarse a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma sarcoma de Ewing, tumor maligno de célula gigante, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales, incluyendo, pero sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco cerebral ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma (de célula pequeña) lobular, carcinoma intraductal, cáncer de mama medular cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tales como, pero sin limitarse a, cáncer papilar o folicular de tiroides, cáncer medular de tiroides y cáncer anaplásico de tiroides; cáncer pancreático, incluyendo, pero sin limitarse a, insulinooma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, somatostatinooma y tumor del islote celular o carcinoide; cánceres de la pituitaria, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, prolactinoma, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares, incluyendo, pero sin limitarse a, melanoma ocular, tales como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula escamosa, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres cervicales, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula escamosa y adenocarcinoma; cánceres uterinos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres ováricos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma ovárico epitelial, tumor de bajo potencial maligno, tumor de célula germinal y tumor estromal; cáncer

esofágicos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de célula (célula pequeña) de avena; cánceres de estómago, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulcerante, de extensión superficial, de extensión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas, incluyendo, pero sin limitarse a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón de célula no-pequeña, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de célula grande y cáncer de pulmón de célula pequeña; cánceres testiculares, incluyendo, pero sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rhabdomyosarcoma; cánceres del pene; cánceres orales incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma quístico adenoide; cánceres de faringe, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas y verrucoso; cánceres de la piel, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma léntigo maligno, melanoma acral lentiginoso; cánceres renales, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de célula renal, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de célula transicional (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilm; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula transicional, cáncer de célula escamosa, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Adicionalmente, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándula sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares, véase Fishman y otros, 1985, Medicine, 2da Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy y otros, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Como consecuencia, las composiciones de la invención son útiles además para tratar o evitar una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, incluyendo (pero sin limitarse a) las siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata cuello uterino, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de célula escamosa; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetracarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannoma; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. Se contempla además que los cánceres causados por alteraciones en la apoptosis pueden tratarse también con las composiciones de la invención. Estos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios no-proliferativos o malignos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, se tratan o impiden con las y composiciones de la invención en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, se tratan o impiden el sarcoma, melanoma o leucemia con las composiciones de la invención.

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante, o un anticuerpo monoclonal terapéutico manipulado genéticamente de acuerdo con los métodos de la invención) inhibe o reduce el crecimiento del tumor primario o metástasis de las células cancerosas por al menos 99 %, al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 45 %, al menos 40 %, al menos 35 %, al menos 30 %, al menos 25 %, al menos 20 %, o al menos 10 % en relación con el crecimiento de tumor primario o metástasis en ausencia de dicha molécula de la invención.

5.4.1.1 Terapia de combinación

La invención abarca además administrar las moléculas de la invención en conjunto con otras terapias conocidas por aquellos con experiencia en la técnica para el tratamiento o prevención de cáncer, que incluye pero sin limitarse a, quimioterapias actuales estándar y experimentales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, terapias con radiación o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en

combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes contra el cáncer, anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, los anticuerpos enumerados en la Tabla 9), u otros agentes conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer (Véase Sección 5.4.1.2).

5 En ciertas realizaciones, una o más molécula de la invención se administra a un mamífero, preferentemente un humano, simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para el tratamiento del cáncer. La expresión "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que quiere decir que una molécula de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que la molécula de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de cualquier otra forma. Por ejemplo, cada agente terapéutico o profiláctico (por ejemplo, quimioterapia, terapia con radiación, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes intervalos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben ser administrados suficientemente próximos en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, de cualquier forma adecuada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, se administran dos o más componentes en la misma visita del paciente

25 En otras realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran a aproximadamente 2 a 4 días de separación, a aproximadamente 4 a 6 días de separación, a aproximadamente 1 semana de separación, a aproximadamente 1 a 2 semanas de separación, o más de 2 semanas de separación. En las realizaciones preferidas, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran en un marco de tiempo donde ambos agentes están aún activos. Una persona con experiencia en la técnica puede ser capaz de determinar un marco de tiempo de ese tipo mediante la determinación de la vida media de los agentes administrados.

35 En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos de la invención se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica involucra la administración de un primer agente por un periodo de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o tercer agente por un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

40 En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico por infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos, y más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

45 En aún otras realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea por infusión continua o administración frecuente y sin periodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede involucrar dosificación a intervalos constantes sin periodos de descanso. Típicamente los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se usan en dosis más bajas. Tales regímenes de dosificación abarcan la administración crónica diaria de dosis relativamente bajas durante periodos prolongados de tiempo. En las realizaciones preferidas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran en dosis bajas crónicas o infusión continua de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 mes, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. La programación de tales regímenes de dosis se puede optimizar por el oncólogo experto.

En otras realizaciones, los cursos de tratamiento se administran simultáneamente a un mamífero, es decir, dosis individuales de los terapéuticos se administran separadamente aún dentro de un intervalo de tiempo de manera que las moléculas de la invención pueden trabajar conjuntamente con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez por semana en conjunto con los otros componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación para los terapéuticos se llevan a cabo simultáneamente aun si los terapéuticos no se administran simultáneamente o dentro de la misma visita del paciente.

Cuando se usa en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, con mayor preferencia de forma sinérgica. En una realización, una molécula de la invención se administra simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición terapéutica. En otra realización, una molécula de la invención se administra simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos distintos en composiciones farmacéuticas separadas. En todavía otra realización, una molécula de la invención se administra antes de o subsecuente a la administración de otro agente terapéutico o profiláctico. La invención contempla la administración de una molécula de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos o profilácticos por las mismas o diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. En ciertas realizaciones ejemplos, cuando una molécula de la invención se administra simultáneamente con otro agente terapéutico o profiláctico que potencialmente produce efectos secundarios adversos que incluyen, pero sin limitarse a, toxicidad, el agente terapéutico o profiláctico puede administrarse favorablemente a una dosis que cae más abajo del umbral que provoca el efecto secundario adverso.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en la presente descripción se engloban en las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Más aun, la dosificación y frecuencia variarán típicamente en función de los factores específicos para cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta e historial médico anterior del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por el experto en la técnica teniendo en cuenta tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones informadas en la bibliografía y recomendadas en Physician's Desk Reference (56va ed., 2002).

5.4.1.2 Otros agentes terapéuticos/profilácticos

En una realización específica, los métodos de la invención abarcan la administración de una o más moléculas de la invención con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o prevención del cáncer. Los inhibidores de la angiogénesis pueden administrarse en combinación con las moléculas de la invención. En una realización, los inhibidores de la angiogénesis pueden usarse en composiciones de la invención incluyen pero sin limitarse a: Angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefina; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento XVIII de colágeno); fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de la heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador de plasminógeno, factor plaquetario-4 (PF4); Prinomastat; fragmento de prolactina de 16kD; proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; tromboespondina-1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformador beta (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesiltransferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerígenos que pueden usarse en conjunto con las moléculas de la invención en las diversas realizaciones de la invención incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, pero sin limitarse a: acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina, altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlins; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimero, carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina, dacarbazina, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromate; epiropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorrubicina; estramustina; fosfato de sodio de estramustina; etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol;

fazarabina, fenretinida, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón-alfa-n3, interferón beta-1 a, interferón gamma-1 b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina, clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbina; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán de sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiafuzurina; vinrosidine tirapazamina; citrato , de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato, glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; uramustina; uredepa; vapreotida; verteporfina, sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleuosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; ceniplatino; cinostatina; clorhidrato de zorrubicina.

Otros fármacos anticancerígenos incluyen, pero sin limitarse a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK, altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulinico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4, análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A, curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina, ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshizrodidemina , B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón, doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos, etanidazol, fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida, flavopiridol; flecelestina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix, inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina, idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento tipo insulina1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplaquinolida; kahalalida F; triacetato de N-lamellarina; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble cadena mal pareado; mitoguzona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor del gen de multiresistencia a fármacos; terapia a base de supresor 1 tumoral múltiple; agente anticancerígeno mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra, nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante nítróxico; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de

paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrixoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactin; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de sodio de pentosán; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol de perillilo; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina, pirarrubicina; piritrexima; plactina A; plactina B; inhibidor del activador de plasminógeno, complejo de platino; compuestos de platino, complejo de platino-triamina; porfímero de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado del polioxietileno de hemoglobina; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de proteína farnesiltransferasa de ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina, inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena simple, sizofirán, sobuzoxano, borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastatina 1, escualamina, inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido superactivo intestinal vasoactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; metiyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona tiroidea estimulante; etiletiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica con eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina, vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimálmero de zinostatina. Los fármacos anticancerígenos adicionales preferidos son 5-fluoroacilo y leucovorina.

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen pero sin limitarse a ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD25 para la prevención del rechazo agudo del aloinjerto renal; PANOREX™ que es un anticuerpo murino IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo murino IgG anti-idiotipo (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG quimérico anti-EGFR (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha V\beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD33 (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD22 (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG humanizada anti-CD3 (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo humanizado anti- factor 5 (C5) del complemento.

(Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab humanizado anti-TNF- α (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 primatizado anti-CD4 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG humano anti-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 humanizado anti-TNF- α (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4\beta 7$ (LeukoSite/Genentech); Orthoclone OKT4A es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD4 (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD40L (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-VLA-4 (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF- $\beta 2$ (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 9.

50 5.4.2 Enfermedad autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc variante por una Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por una Fc γ RIIA. Las moléculas de la invención con tales características de unión son útiles al regular la respuesta inmune, por ejemplo, al inhibir la respuesta inmune en relación con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no pretende estar ligado a cualquier mecanismo de acción, las moléculas de la invención con una afinidad mejorada por una Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por una Fc γ RIIA pueden conducir a frenar la respuesta de activación a Fc γ R y la inhibición de la respuesta celular.

En algunas realizaciones, una molécula de la invención que comprende una región Fc variante no es una inmunoglobulina, y comprende al menos una modificación de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB en relación con una molécula que comprende una región Fc silvestre. En otras realizaciones, dicha molécula comprende además una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones disminuye la afinidad de la molécula por una FcγR activadora. En algunas realizaciones, la molécula es una región Fc soluble (es decir, no unida a membrana). La invención contempla otras modificaciones de aminoácidos dentro de la región Fc soluble que modulan su afinidad por varios receptores Fc, que incluyen aquellos conocidos para una persona con experiencia en la técnica como se describe en la presente. En otras realizaciones, la molécula (por ejemplo, la región Fc que comprende al menos uno o más modificaciones de aminoácidos) se modifica usando técnicas conocidas para una persona con experiencia en la técnica y como se describe en la presente para aumentar la vida media in vivo de la región Fc. Tales moléculas tienen utilidad terapéutica en tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune. Aunque no pretende estar ligado a cualquier mecanismo de acción, tales moléculas con afinidad mejorada por un FcγRIIB conducirán a una pérdida de los receptores activadores y así la pérdida de la respuesta inmune y tendrán eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune.

En ciertas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos, las cuales aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina, y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina. En una realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, las cuales aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 247 con leucina. En otra realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, las cuales aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 372 con tirosina. En aun otra realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, las cuales aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico. En una realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, las cuales aumentan la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por una FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 224 con leucina.

Las regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por una FcγRIIB and una afinidad disminuida por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre, pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Las moléculas de la presente invención pueden ser usadas en métodos para prevenir, tratar, o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmune o inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por una FcγRIIB y una afinidad disminuida por una FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre.

Las moléculas de la invención también pueden ser usadas en métodos para prevenir, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende además, administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. Las moléculas de la invención también pueden ser usadas en métodos para prevenir, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune que comprende además, administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.4.2.1 proporciona los ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse administrando las moléculas de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, orquitis y ovaritis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, penfigoide ampollosa cardiomiopatía, dermatitis canal celiaco síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica síndrome de Churg-Strauss penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de crioglobulina, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por inmunidad o de tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica,

fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/ arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis de dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitarse a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en la presente en la sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios se asocian con una afección inflamatoria. Así, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunitarios pueden caracterizarse también como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden evitarse, tratarse o manejarse usando las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios que pueden manipularse genéticamente de acuerdo con la divulgación se presenta en la Tabla 10A, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos autoinmunes se presenta en la Tabla 10B.

TABLA 10A: ANTICUERPOS PARA ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES QUE PUEDEN MANIPULARSE GENÉTICAMENTE DE ACUERDO CON LA DIVULGACIÓN

Nombre anticuerpo	del	antígeno objetivo	tipo de producto	de	Isotipo	patrocinadores	Indicación
5G1.1		Complemento (C5)	Humanizado		IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5.G1.1		Complemento (C5)	Humanizado		IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1		Complemento (C5)	Humanizado		IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC		Complemento (C5)	Humanizado		ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC		Complemento (C5)	Humanizado		ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC		Complemento (C5)	Humanizado		ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL		CBL	Humano			Abgenix Inc	GvHD
ABC-CBL		CD147	Murino		IgG	Abgenix Inc	rechazo de aloinjerto
ABX-IL8		IL-8	Humano		IgG2	Abgenix Inc	Soriasis
Antegren		VLA-4	Humanizado		IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a		CD11a	Humanizado		IgG1	Genentech Inc/Xoma	Soriasis
Anti-CD18		CD18	Humanizado		Fab/2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1		CD18	Murino		Fab/2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	rechazo de aloinjerto
Antova		CD40L	Humanizado		IgG	Biogen	rechazo de aloinjerto
Antova		CD40L	Humanizado		IgG	Biogen	SLE
BTI-322		CD2	Rata		IgG	Medimmune Inc	GvHD, Soriasis
CDP571		TNF-alfa	Humanizado		IgG4	Celltech	Crohn's
CDP571		TNF-alfa	Humanizado		IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850		Selectina E	Humanizado			Celltech	Soriasis
Corsevin M		Fact VII	quimérico			Centocor	Anticoagulante
D2E7		TNF-alfa	Humano			CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G		CD11/18	Humanizado			ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G		CD11/18	Humanizado		IgG	ICOS Pharm Inc	Derrame
IC14		CD14				ICOS Pharm Inc	choque tóxico
ICM3		ICAM-3	Humanizado			ICOS Pharm Inc	Soriasis
IDEC-114		CD80	Primatizado			IDEC Pharm/Mitsubishi	Soriasis
IDEC-131		CD40L	Humanizado			IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131		CD40L	Humanizado			IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151		CD4	Primatizado		IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152		CD23	Primatizado			IDEC Pharm	Asma/Alergia
Infliximab		TNF-alfa	quimérico		IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab		TNF-alfa	quimérico		IgG1	Centocor	Crohn's

LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Derrame
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	rechazo de aloinjerto
LDP-02	alpha4beta7	Humanizado	Inc	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerativa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab/2	Knoll Pharm, BASF	choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centon	trastornos hematológicos autoinmunitarios
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Soriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	rechazo de aloinjerto
RepPro/Abciximab	gpIIb/IIIa	quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/Alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/Alergia
Simulect	CD25	quimérico	IgG1	Novartis Pharm	rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Soriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	rechazo de aloinjerto

TABLA 10B: ANTICUERPOS PARA TRASTORNOS AUTOINMUNES QUE PUEDEN MANIPULARSE GENÉTICAMENTE DE ACUERDO CON LA DIVULGACIÓN

Anticuerpo.	Indicación	antígeno objetivo
ABX-RR2		anticuerpo para el antígeno CBL en las células T, células B y células NK. anticuerpo completamente humano a partir de Xenomouse
Sc8 (anticuerpo anti-ligando CD-40)	Ensayos fase II se interrumpieron en octubre de 1999 examinar "eventos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	Artritis reumatoide	primatizado ; anti-CD4
IDEC 152	Asma	anti-CD23 primatizado
IDEC 114	Soriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn soriasis	anti-CD2
LDP-02 (anti-b7 mAb)	enfermedad inflamatoria del intestino enfermedad de Chron colitis ulcerativa	receptor de integrina $\alpha 4\beta 7$ en glóbulos blancos (leucocitos)
anticuerpo SMART Anti-interferón gamma	Trastornos autoinmunitarios	Anti-interferón gamma
Verteportin	Artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos de la sangre causado por reacciones autoinmune Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal contra receptores FcR1
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otras autoinmunitarias	anticuerpo monoclonal contra la molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunitarios de esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria del intestino lupus psoriasis	inhibidor de la monofosfato inosina deshidrogenasa (enzima necesaria para fabricar el nuevo ADN y ARN usados en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	Artritis reumatoide	inhibidor de interleucina-1 beta ICE (enzima de conversión rutas controles que conducen a la respuesta inmune agresiva)
VX-745	especifico a la inflamación involucrada en la señalización química de aparición de la respuesta inmune y progresión de la inflamación	inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógeno quinasa p38MAP
Enbrel (etanercept)		objetivos de TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-6		anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL-6 (interleucina 6)
Apogen MP4		antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas a la enfermedad induce la apoptosis de células T eliminadas por muerte celular programada ya no más ataque de las propias células específicas del cuerpo a apógenos de células T específicas objetivos

5.4.2.1 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

5 Las moléculas de la presente invención pueden ser usadas en métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprende la administración de las moléculas con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por una Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por una Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA en conjunto con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitarse a, los antibióticos metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, y macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptor de células T y moduladores receptores de citocinas.

10

Los agentes antiinflamatorios resultaron exitosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarias y actualmente son un tratamiento común y estándar para tales trastornos. Puede usarse cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica en los métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de NSAIDs incluyen, pero sin limitarse a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), cetoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFENT™), sulindaco (CLINORIL™), tolmetina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRONACTRON™) y nabumetona (RELAFENT™). Dichos NSAID funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero sin limitarse a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

5.4.3 Enfermedades infecciosas

15 Las moléculas de la invención pueden ser usadas en métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por las moléculas de la invención son provocadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, protozoos, y virus.

20 Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simplex tipo I (HSV-I), herpes simplex tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II), y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

25 Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención, que son causadas por bacterias incluyen, pero sin limitarse a, rickettsia micobacterias, micoplasma, neisseria, S. pneumoniae, Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), bacilo antracis (ántrax), tétanos, estreptococo, estafilococo, micobacterias, tétanos, pertussis, cólera, peste, difteria, clamidia, S. aureus y Legionella.

30 Enfermedades por protozoos que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención, que se causan por protozoos incluyen pero sin limitarse a, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención, que se causan por parásitos incluyen, pero sin limitarse a clamidia y rickettsia.

35 De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes tienen función efectora de anticuerpo mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patogénica, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre. Ejemplos de agentes infecciosos incluyen pero sin limitarse a (por ejemplo, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecialis, Candida albicans, Proteus vulgaris, Staphylococcus viridans, y Pseudomonas aeruginosa), un patógeno (por ejemplo, papovavirus B-linfotrópico (LPV); Bordatella pertussis; virus de la Enfermedad de Borna (BDV); Coronavirus bovino; Virus de la Coriomeningitis; Virus del dengue, un virus, E. coli; Ébola; Ecovirus 1; Ecovirus-11 (EV); Endotoxina (LPS); Bacterias entéricas, Virus huérfano entérico; Enterovirus; Virus de la leucemia felina; Virus de la fiebre aftosa; Virus de la leucemia simio Gibbon (GALV); bacterias Gram-negativas; Helicobacter pylori; Virus de la Hepatitis B (VHB); Virus del Herpes Simple; VIH-1; Citomegalovirus humano; Coronavirus humanos; Influenza A, B & C ; Legionella; Leishmania mexicana; Listeria monocitogenes; virus del sarampión; Meningococo; Morbilivirus; Virus de la hepatitis del ratón; Virus de la leucemia murina; Virus herpes gamma murino; Retrovirus murino; Virus de la hepatitis de ratón coronavirus murino; Mycobacterium avium-M; Neisseria gonorrea; Virus de la enfermedad de Newcastle; Parvovirus B 19; Plasmodium falciparum; Virus de la viruela; Pseudomonas; Rotavirus; Typhiurium Samonella; Shigella; Estreptococos; virus 1 linfotrópico de células T; virus vaccinia).

En una realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa al mejorar la fagocitosis y/o opsonización del agente infeccioso que causa la enfermedad infecciosa. En

otra realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa al mejorar la ADCC de las células infectadas que provocan la enfermedad infecciosa.

- En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa. La invención contempla el uso de las moléculas de la invención en combinación con antibióticos conocidos para aquellos con experiencia en la técnica para el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitarse a, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina (Floxin®), ciprofloxacina (Cipro®) o norfloxacina (Noroxin®)), antibióticos aminoglicósido (por ejemplo, apramicina, arbecacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, neomicina, neomicina, undecilinato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomocina), antibióticos fenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos ansamicinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefenos (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem y imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftiofan, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol, y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefemos (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido benzilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamcillina, hidroyoduro penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilina y fencihicilina de potasio), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina, y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, endurecidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, y cloruro furazolium), quinolonas y análogos de estos (por ejemplo, cinoxacina "clinafloxacina, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona de sodio y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.
- En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Agentes antifúngicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen pero sin limitarse a la anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrin, naftifina, terbinafina, undecilinato y griseofulfin.
- En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivirales. Agentes antivirales útiles que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitarse a, inhibidores de proteasa, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa y análogos de nucleósido. Ejemplos de agentes antivirales incluyen pero sin limitarse a zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.5 Terapia con vacuna

- La invención abarca además usar una composición de la invención para inducir una respuesta inmune contra un agente antigénico o inmunogénico, que incluye pero sin limitarse a, antígenos de cáncer y antígeno de enfermedad infecciosa (ejemplos de los cuales se describen) más abajo). Las composiciones de la vacuna de la invención comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos para los que se desea una respuesta inmune, en donde uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos se recubre con una variante de anticuerpo de la invención que tiene una afinidad mejorada a FcγRIIIA. Aunque no pretende estar ligado a cualquier mecanismo particular de acción, recubrir un agente antigénico o inmunogénico con una variante de anticuerpo de la invención que tiene una afinidad mejorada a FcγRIIIA, mejora la respuesta inmune al agente antigénico o inmunogénico deseado induciendo respuestas humoral y mediada por células. Las composiciones de la vacuna de la invención son particularmente eficaces al provocar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmune protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

- En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de la vacuna de la invención comprenden un virus contra el que se desea una respuesta inmune. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos, y son preferentemente atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos, y atenuados

5 puede realizarse usando los métodos estándares conocidos para una persona con experiencia en la técnica. La invención, abarca una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada que se formula de acuerdo con la invención. Una vacuna viva puede ser preferida porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar a la que ocurre en las infecciones naturales, y por lo tanto, confiere inmunidad sustancial de larga duración. La producción de tales formulaciones de vacunas vivas de virus recombinantes puede conseguirse usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en las alantoides de embrión de pollo seguido por purificación.

10 En una realización específica, el virus recombinante no es patogénico para el sujeto al cual se le administra. Con respecto a esto, el uso de virus manipulados genéticamente para propósitos de vacunas puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones adecuadas (por ejemplo, deleciones) en los moldes usados para la transfección puede proporcionar nuevos virus con características de atenuación. Por ejemplo, mutaciones específicas de sentido erróneo que se asocian con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío pueden prepararse en mutaciones de delección. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o temperatura y las frecuencias de reversión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para manipular genéticamente los virus recombinantes se conocen en la técnica y abarcan en la invención. Por ejemplo, las técnicas para modificar los virus de ARN de cadena negativa son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos con núm. 5,166,057, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

20 Alternativamente, los virus quiméricos con características "suicidas" pueden construirse para el uso en las formulaciones de vacuna intradérmica de la invención. Tales virus pueden atravesar solamente una o unas pocas rondas de replicación dentro del huésped. Cuando se usa como una vacuna, el virus recombinante puede experimentar ciclo (s) de replicación limitado (s) e inducir un nivel suficiente de respuesta inmune pero no puede ir más adelante en el huésped humano y causar la enfermedad. Alternativamente, el virus inactivado (destruido) se puede formular de acuerdo con la invención. Las formulaciones de vacunas inactivadas se pueden preparar usando técnicas convencionales para "destruir" a los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están "muertas" en el sentido de que se ha destruido su infectividad. Lo ideal sería que la infectividad del virus se destruya sin afectar su inmunogenicidad. Para preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede cultivarse en un cultivo celular o en la alantoides del embrión de pollo, purificarse por ultracentrifugación zonal, inactivarse por formaldehído o β -propiolactona, y mezclarse.

30 En ciertas realizaciones, epítopos completamente extraños, que incluyen los antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales pueden manipularse genéticamente en el virus para el uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas de la invención. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados tales como el VIH (gp160, gp120, gp41) antígenos parasitarios (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales puede manipularse genéticamente en la cepa atenuada.

35 Virtualmente cualquier secuencia génica heteróloga puede construirse en el virus quimérico de la invención para el uso en las formulaciones de vacuna intradérmica. Preferentemente, las secuencias de genes heterólogos son porciones y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferentemente, los epítopos que inducen una respuesta inmunitaria protectora a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que unen anticuerpos neutralizantes puede expresarse por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, secuencias de genes heterólogos que pueden construirse en los virus quiméricos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, influenza y parainfluenza hemaglutinina neuraminidasa y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F de PIV3 humano. En aún otra realización, las secuencias de genes heterólogos que pueden manipularse genéticamente en los virus quiméricos incluyen aquellos que codifican proteínas con actividad inmuno-moduladora. Ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen pero sin limitarse a, citoquinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina-1, -2, -4, -5, -6, -12, y los antagonistas de estos agentes.

En aún otras realizaciones, la invención abarca células o virus patogénicos, preferentemente virus atenuados, que expresan la variante de anticuerpo en su superficie.

50 En realizaciones alternativas, las composiciones de la vacuna de la invención comprenden un polipéptido de fusión en donde un agente antigénico o inmunogénico se enlaza operativamente a una variante de anticuerpo de la invención que tiene una afinidad mejorada por un Fc γ RIIIA. Manipular genéticamente polipéptidos de fusión para el uso en las composiciones de vacuna de la invención se realiza usando métodos de tecnología de ADN recombinante de rutina y está dentro del nivel del experto.

55 La invención abarca además los métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición de la invención. Preferentemente una composición adecuada para inducir tolerancia en sujeto, comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con una variante de anticuerpo de la invención, en donde la variante de

anticuerpo tiene afinidad más alta a FcγRIIB. Aunque no pretende estar ligado a un mecanismo particular de acción, tales composiciones son eficaces al inducir tolerancia mediante la activación de la vía inhibitoria mediada por FcγRIIB.

5.6 Composiciones y métodos de administración

5 La invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden regiones Fc variantes. La invención también proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejoría de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, administrando a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención.
 10 En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión, o una molécula conjugada, está sustancialmente purificada (es decir., sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono tales como, un mono cangrejero y un humano). En una realización preferida, el sujeto es un humano. En aún otra realización preferida, el anticuerpo de la invención es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen y pueden usarse diversos sistemas de entrega para administrar una composición que comprende moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos), que comprende regiones Fc variantes, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (Véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero sin limitarse a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosa (por ejemplo, rutas intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la invención se administran intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, la administración pulmonar puede emplearse además, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de atomización. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,019,968; 5,985, 320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y las publicaciones del PCT núms. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La invención proporciona además que las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden regiones Fc variantes, se envasan en un contenedor herméticamente cerrado tal como una ampollita o un sobre indicando la cantidad de anticuerpo. En una realización, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente cerrado y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración adecuada para su administración a un sujeto. Preferentemente, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un contenedor herméticamente cerrado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, con mayor preferencia al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la invención deben conservarse a entre 2 y 8 °C en su contenedor original y las moléculas deben administrarse dentro de un plazo de 12 horas, preferentemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después que se reconstituyen. En una realización alternativa, las moléculas se suministran en forma líquida en un contenedor herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de las moléculas de la invención se suministra en un contenedor herméticamente cerrado con al menos 1 mg/ml, con mayor preferencia al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos de 200 mg /ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa a ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la seriedad de la afección, y debe ser decidida de acuerdo al criterio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba del modelo animal o in vitro.

55 Para anticuerpos que se abarcan por la invención, la dosificación administrada a un paciente típicamente es de 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un

- paciente está entre 0.0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0.0001 y 2 mg/kg, 0.0001 y 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg y 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg a 0.25 mg/kg, 0.0001 a 0.15 mg/kg, 0.0001 a 0.10 mg/kg, 0.001 a 0.5 mg/kg, 0.01 a 0.25 mg/kg o 0.01 a 0.10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una media vida dentro del cuerpo del humano más
- 5 prolongada que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune frente a los polipéptidos exógenos. Así, es frecuentemente posible, dosificaciones inferiores de anticuerpos humanos y la administración menos frecuente. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención o sus fragmentos pueden reducirse mejorando la captación y penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tal como, por ejemplo, la lipidación.
- 10 En una realización, la dosificación de las moléculas de la invención administrada a un paciente es de 0.01 mg a 1000 mg/día, cuando se usan como agente terapéutico único. En otra realización, las moléculas de la invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es más baja que cuando dichas moléculas se usan como agente terapéutico único.
- 15 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no en forma de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas o fibras. Preferentemente, al administrar una molécula de la invención, se debe tomar cuidado de usar materiales a los cuales no se absorba la molécula.
- 20 En otra realización, las composiciones pueden entregarse en una vesícula, particularmente, un liposoma (Véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibidem.*, págs. 3 17-327; véase en general, *ibidem.*).
- 25 En aún otra realización, las composiciones pueden entregarse en un sistema de liberación controlada o sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más moléculas de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,526,938; la publicación del PCT WO 91/05548; la publicación del PCT WO 96/20698; Ning y otros, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song y otros, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek y otros, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam y otros, 1997, "Microencapsulation of Recombinant anticuerpo humanizado monoclonal for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.
- 30 En otra realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald y otros, 1980, *Surgery* 88:507; y Saudek y otros, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr una liberación controlada de los anticuerpos (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase además Levy y otros, 1985, *Science* 228:190; During y otros, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard y otros, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); la patente de Estados Unidos núm. 5,679,377; la patente de Estados Unidos núm. 5,916,597; la patente de Estados Unidos núm. 5,912,015; la patente de Estados Unidos núm. 5,989,463; la patente de Estados Unidos núm. 5,128,326; la publicación del PCT núm. WO 99/15154; y la publicación del PCT núm. WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitarse a, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli (láctida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al objetivo terapéutico (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). En otra realización, se describen además las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada que se usan de acuerdo con Dunn y otros (véase U.S. 5,945,155). Este método en particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo a partir del sistema de polímero. La implantación generalmente puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de
- 35 entrega sostenido no polimérico, para el que se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como un sistema de entrega del fármaco. Después de la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se
- 40
- 45
- 50
- 55

disipará, dispersará o se filtrará desde la composición en el fluido del tejido circundante y el material no polimérico coagulará o precipitará de forma gradual para formar una matriz microporosa sólida (Véase U.S. 5,888,533).

Los sistemas de liberación controlados son discutidos en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,526,938; las publicaciones internacionales núms. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning y otros, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song y otros, 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek y otros, 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam y otros, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

5 En una realización específica en la cual la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico puede administrarse in vivo para promover la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo tal que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de Estados Unidos núm. 4,980,286), o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolística, Dupont) o recubriéndolo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, administrándolo enlazado a un péptido de tipo caja homeótica que se conoce que entra en el núcleo (véase por ejemplo, Joliot y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

10 Para anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es, típicamente, de 0.1 mg/kg a 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. Preferentemente, la dosificación administrada a un sujeto es de entre 0.1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del sujeto y, con mayor preferencia, la dosificación administrada a un sujeto es de entre 1 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. La dosificación y la frecuencia de administración de anticuerpos de la invención pueden reducirse además mejorando la captación y penetración en el tejido (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

15 El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de moléculas de la invención puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con moléculas en el intervalo de entre aproximadamente 0.1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante un periodo entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, con mayor preferencia entre aproximadamente 3 a 7 semanas e incluso con mayor preferencia durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez por semana, dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez por año. Se apreciará además que la dosificación eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento en particular.

5.6.1 Composiciones farmacéuticas

20 Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Estas composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en la presente invención o una combinación de los agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización particular, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA y/o dicha región Fc variante media una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre se une a FcγRIIIA, y dicha región Fc variante se une a FcγRIIB con una afinidad más baja

que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre se une a FcγRIIB, y/o dicha región Fc variante media una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además una o más agentes contra el cáncer.

- 5 La invención abarca además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico al tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc determinado de acuerdo con la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa, aprobado para su uso en animales, y más particularmente para el uso en humanos, por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas generalmente reconocidas. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Estos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas se pueden emplear también como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida.

25 Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se proporcionan separadamente, o mezclados conjuntamente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado como una ampolleta o bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra por infusión, ésta se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

35 Las composiciones de la invención pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, las que se forman con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las que se forman con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5.6.2 Terapia génica

40 En una realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican las moléculas de la invención, se administran para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección, por vía de terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificado que media un efecto terapéutico o profiláctico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos ilustrativos se describen más abajo.

45 Para las revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel y otros., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la ingeniería genética pueden usarse como se describe en Ausubel y otros. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

50 En un aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado.

Particularmente, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, operativamente enlazados a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico al tejido. En otra realización particular, las moléculas de ácido nucleico se usan en las que secuencias de codificación del anticuerpo y cualesquiera de otras secuencias deseadas se flanquean por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra y otros., 1989, Nature 342:435-438).

En otro aspecto preferido, una composición de la invención comprende los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, siendo dichos ácidos nucleicos una parte de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped adecuado. Particularmente, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, operativamente enlazados a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y opcionalmente, específico al tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia de codificación de la proteína de fusión y cualesquiera otras secuencias deseadas se flanquean por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

La entrega de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser ya sea directa, en el caso que el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores portadores de ácido nucleico, o indirecta, en el caso que, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos in vitro, se trasplantan después en el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica in vivo o ex vivo.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico directamente se administran in vivo, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de manera que se convierten en intracelular por ejemplo, por la infección usando vectores virales defectuosos, o retrovirales atenuados u otros (Véase la patente de Estados Unidos 4,980,286), o por inyección directa de ADN desnudo, o por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolos con enlace a un péptido que se conoce que entra al núcleo, administrándolo con enlace a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (Véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que puede usarse para tipos celulares objetivos que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización los complejos ácido nucleico-ligando pueden formarse en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, lo que permite al ácido nucleico evitar la degradación lisosomal. En aún otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse in vivo para la captación y expresión específica de la célula, dirigiendo un receptor específico (Véase, por ejemplo, publicaciones del PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para la expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra y otros., 1989, Nature 342:435-438).

En una realización específica, se usan los vectores virales que contienen las secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo puede usarse un vector retroviral (véase Miller y otros., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaque del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se usa en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la entrega de la secuencia de nucleótidos en un sujeto. Más detalle acerca de los vectores retrovirales se pueden encontrar en Boesen y otros., (1994, Biotherapy 6:291-302), que describe el uso de un vector retroviral para entregar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas para hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes y otros., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein y otros., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human terapia génica 4:129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en la terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para entregar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de entrega basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales, y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaz de infectar las células que no se dividen. Kozarsky y Wilson (Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993, presentan un análisis de la terapia génica basada en adenovirus. Bout y otros., (Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en la terapia génica pueden encontrarse en

Rosenfeld y otros, 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld y otros, 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli y otros, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; publicación del PCT WO94/12649; y Wang y otros., 1995, Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida, se usan los vectores de adenovirus.

5 Los virus adeno asociados (AAV) se han propuesto para usar en terapia génica (Véase, por ejemplo, Walsh y otros, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y la patente de los Estados Unidos núm. 5,436,146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo de tejido por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan después bajo la selección para aislar las células que están ocupadas y que expresan el gen transferido. Esas células se administran entonces a un sujeto.

10

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, que incluye pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélula, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en la materia para la introducción de genes extraños en las células (Véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618, Cohen y otros, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; y Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985) y se pueden usar de acuerdo con la presente invención, siempre que no se interrumpan las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico es expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie.

15

20

Las células recombinantes resultantes se pueden entregar en un sujeto por varios métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para el uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede determinarse por una persona con experiencia en la técnica.

25

Las células en las que un ácido nucleico puede introducirse para propósitos de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible, deseado, e incluyen pero sin limitarse a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, particularmente células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

30

En una realización preferida, la célula que se usa para terapia génica es autóloga al sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de manera que son expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después in vivo para el efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquiera de las células madre y/o progenitoras que pueden aislarse y mantenerse in vitro potencialmente pueden usarse de acuerdo con esta realización de la presente invención (Véase por ejemplo, Publicación del PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 7 1:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

35

40 En una realización específica, el ácido nucleico que se introduce para propósitos de terapia génica comprende un promotor inducible operativamente enlazado a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico es controlable mediante el control de la presencia o ausencia del inductor adecuado de la transcripción

5.6.3 Kits

La invención proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más contenedores rellenos con las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes). Además, pueden incluirse también en el envase o kit farmacéutico uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. La invención también proporciona un paquete o kit del producto farmacéutico o veterinario que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, puede haber un aviso asociado con tal(es) contenedor(es) en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de los productos

45

50

farmacéutico o biológicos, donde el aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

5 La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un estuche comprende una o más moléculas de la invención. En otra realización, el estuche comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más contenedores. En otra una realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que unen uno o más antígenos cancerosos asociados con el cáncer. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

10 5.7 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas o agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se prueban, preferentemente in vitro, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para evaluar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en los humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica deseada, incluye ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido de un paciente se cultiva en un cultivo, y se expone a o de cualquier otra forma se pone en contacto con una composición farmacéutica de la invención, y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse mediante la biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profilácticamente o terapéuticamente más eficaz(es) para cada paciente individual. En diversas realizaciones específicas, ensayos in vitro pueden llevarse a cabo con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado en estos tipos de células.

Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en humanos. Estos sistemas de modelos animales incluyen, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En una realización específica de la invención, se prueban combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo en ratón. Estos sistemas de modelo se usan ampliamente y se conocen bien por el técnico con experiencia. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal para administrar los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si estos agentes se administran separadamente o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos para el uso en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγRs humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en el documento U.S. 5,877,396 puede usarse en la presente invención. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, ratones portadores de FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano, ratones portadores de FcγRIIB y FcγRIIA humano.

Preferentemente, las mutaciones que muestran los más altos niveles de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se probarán para el uso en estudios en modelos animales antes de usar en humanos. Los anticuerpos que albergan los mutantes Fc identificados usando los métodos de la invención y probados en ensayos de ADCC, que incluyen ch4D5 y ch520C9, dos anticuerpos anti-Erb-B2, y chCC49, un anticuerpo anti-TAG72, se prefieren para el uso en modelos animales, ya que se han usado previamente en modelo de xenoinjerto de ratón (Hudsiak y otros., 1989, Mol. Cell Biol. 9: 1165-72; Lewis y otros., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-63; Bergman y otros., 2001 Clin. Cancer Res. 7: 2050-6; Johnson y otros., 1995, Anticancer Res. 1387-93). Cantidades suficientes de anticuerpos pueden prepararse para el uso en modelos animales usando los métodos descritos arriba, por ejemplo usando sistemas de expresión de mamíferos y métodos de purificación de IgG descritos y ejemplificados en la presente descripción. Un experimento típico requiere al menos aproximadamente 5.4 mg de anticuerpo mutante. Este cálculo se basa en cantidades promedios de anticuerpo silvestre necesario para proteger de 8-10 ratones de 30 g después de una dosis de carga de 4 µg/g y una dosis de mantenimiento semanal, 2 µg/g, durante diez semanas. La invención abarca líneas de células tumorales como una fuente para los tumores de xenoinjertos, tales como células SK-BR-3, BT474 y HT29 que se derivan de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto los receptores Erb-B2 como de la prolactina en su superficie. Las células SK-BR-3 se han usado con éxito tanto en modelos de ADCC como xenoinjertos de tumores. En otros ensayos pueden usarse células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano. Estas células expresan el antígeno TAG72 en la superficie celular y pueden usarse junto con el anticuerpo chCC49. El uso de diferentes anticuerpos y múltiples modelos de tumores evadirán la pérdida de cualquiera de las mutaciones específicas debido a una incompatibilidad del mutante de Fc específico del anticuerpo.

Modelos de xenoinjerto en ratón pueden usarse para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra un objetivo específico de tumor basado en la afinidad y la especificidad de las regiones CDR de la molécula de anticuerpo y la capacidad de la región Fc del anticuerpo para provocar una respuesta inmune (Wu y otros., 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan FcγRs humanas en células efectoras de ratones son únicos y son modelos animales hechos a la medida para probar la eficacia de las interacciones Fc-FcγR. Pares de líneas de ratones transgénicos FcγRIIIA, FcγRIIIB y FcγRIIA generados en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (A través de un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer Center) se pueden usar tal como los enumerados en la Tabla 11 más abajo.

Tabla 11: Cepas de ratones

Fondo de la Cepa	FcR humano
Desnudo / CD16A KO	ninguno
Desnudo / CD16A KO	FcγRIIIA
Desnudo / CD 16A KO	FcγR IIA
Desnudo / CD 16A KO	FcγR IIA y IIIA
Desnudo / CD32B KO	ninguno
Desnudo / CD32B KO	FcγR IIB

Preferentemente los mutantes Fc que muestran tanto la unión mejorada a FcγRIIIA como la unión reducida a FcγRIIB, actividad aumentada en ensayos de ADCC y fagocitosis se prueban en experimentos con modelos animales. Los experimentos en modelos animales examinan el aumento de la eficacia de los anticuerpos que contienen el mutante de Fc en ratones knockout desnudos mCD16A , transgénico FcγRIIIA, en comparación con un control al que se ha administrado el anticuerpo nativo. Preferentemente, se examinan grupos de 8-10 ratones usando un protocolo estándar. Un modelo animal ilustrativo puede comprender las siguientes etapas: en un modelo de cáncer de mama, ~2 x 10⁶ células SK-BR-3 se inyectan por vía subcutánea en el día 1 con 0.1 mL de PBS con mixta Matrigel (Becton Dickinson). Inicialmente un anticuerpo quimérico silvestre y control de isotipo se administran para establecer una curva de la dosis terapéutica predeterminada, la inyección intravenosa de 4D5 en el día 1 con una dosis inicial de 4 µg/g, seguido por inyecciones semanales de 2 µg/g. El volumen del tumor se monitorea durante 6-8 semanas para medir el progreso de la enfermedad. El volumen del tumor debe aumentar linealmente con el tiempo en los animales inyectados con el control de isotipo. En contraste muy poco crecimiento del tumor debe ocurrir en el grupo inyectado con 4D5. Los resultados del estudio de dosis estándar se usan para establecer un límite superior para los experimentos que evalúan los mutantes Fc. Estos estudios se realizan usando dosis subterapéuticas de los anticuerpos que contienen mutante de Fc. Una dosis de un décimo se usó en los modelos de xenoinjertos en experimentos realizados en ratones knockout FcγRIIB, Véase, Clynes y otros., 2000, Nat. Med. 6: 443-6, con un bloqueo resultante en el crecimiento de las células tumorales Ya que los mutantes de la invención preferiblemente muestran un aumento en la activación de FcγRIIIA y reducción de la unión a FcγRIIB los mutantes se examinan a dosis terapéutica de un décimo. El examen del tamaño del tumor a diferentes intervalos indica la eficacia de los anticuerpos en la dosis inferior. El análisis estadístico de los datos usando la prueba t proporciona una manera de determinar si los datos son significativos. Los mutantes Fc que muestran eficacia aumentada se prueban en dosis progresivamente más bajas para determinar la dosis más pequeña posible como medida de su eficacia.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención puede determinarse usando diversos modelos experimentales animales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty y otros. (eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Los modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias pueden usarse también para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención. A continuación se proporcionan algunos ensayos como ejemplos, y no a modo de limitación.

Los principales modelos animales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de artritis inducida por adyuvantes en rata, modelos de artritis inducida por colágeno en ratón y rata y modelos de artritis inducida por antígeno en rata, conejo y hámster, todos descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty y otros. (eds.), Capítulo 30 (Lee and Febiger, 1993), incorporados en la presente como referencia en su totalidad.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención puede evaluarse usando un modelo de artritis inducida por carragenina en rata. La artritis inducida por carragenina se ha usado además en conejo, perro y cerdo en estudios de inflamación o artritis crónica. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se usa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar un modelo de artritis inducida por carragenina de este tipo se describen en Hansra P. y otros, "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat," *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). Comúnmente se usan además modelos animales de inflamación inducida por cimosano, como se conoce y se describe en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención puede evaluarse además midiendo la inhibición del edema en la pata inducido por carragenina en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter .C. A y otros, "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se usó como un tamiz primario in vivo de la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los NSAID y se considera predictivo de la eficacia en humano. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos probados se expresa como el porcentaje de inhibición del incremento del peso de la pata trasera del grupo prueba en relación con el grupo de control dosificado con el portador.

Además, los modelos animales para enfermedad inflamatoria del intestino se pueden usar además para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la presente invención (Kim y otros, 1992, *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Suppl):3S-10S). La colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino que pueden inducirse en los animales. Los polisacáridos sulfatados, incluyendo, pero sin limitarse a, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a los animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

Los modelos animales para trastornos autoinmunitarios pueden usarse también para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Se desarrollaron modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes de tipo 1 sytemic, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders y otros, 1999, *Autoimmunity* 29:235-246; Krogh y otros, 1999, *Biochimie* 81:511-515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19:12-24).

Más aun, pueden usarse cualquiera de los ensayos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la presente invención para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia terapéutica de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos usando moléculas de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal del 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz para el 50 % de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD50/ED50. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tomar la precaución de diseñar un sistema de entrega que dirija estos agentes al sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en humanos. La dosificación de estos agentes se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de circulación en plasma que incluya la IC50 (es decir, la concentración de compuesto prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determinó en cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

La actividad anticancerígena de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención puede determinarse también usando diversos modelos animales de experimentación para el estudio del cáncer, tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsters, conejos etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology*

Research (1991, eds. Boven y Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher), incorporadas en la presente como referencia en su totalidad.

- 5 Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la invención son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas de células tumorales que pueden usarse como una fuente para los tumores de xenoinjertos incluyen pero sin limitarse a, células SKBR3 y MCF7, que pueden ser derivadas de los pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto receptores erbB2 como prolactina. Las células SKBR3 se han usado de forma rutinaria en la técnica como modelos de ADCC y tumores de xenoinjertos. Alternativamente, las células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano pueden usarse como una fuente de tumores de xenoinjertos
- 10 Los protocolos y composiciones de la invención se prueban, preferentemente in vitro, y después in vivo, para la actividad profiláctica o terapéutica deseada, antes de su uso en humanos. Los agentes terapéuticos y métodos pueden tamizarse usando células de una línea celular tumoral o maligna. Muchos ensayos estándar en la técnica pueden usarse para evaluar esta supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de 3H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul tripán, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en la preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular, etc.
- 15
- 20 Los compuestos para su uso en la terapia pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de probarlos en humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsters, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos pueden usarse después en los ensayos clínicos adecuados.
- 25 Más aun, puede usarse cualquier ensayo conocido por aquellos con experiencia en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la invención para el tratamiento o prevención del cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmunitaria.

6. Ejemplos

- 30 Usando un sistema de presentación en levadura, las regiones mutante de Fc de cadena pesada IgG1 humana se tamizaron para la afinidad modificada a diferentes receptores Fc. Particularmente, una genoteca de mutante de Fc se generó por PCR propenso a error (GeneMorph, Stratagene), y después las proteínas del mutante de Fc se fusionaron a la proteína de la pared celular Aga2p, lo que permitió a la proteína de fusión que se secrete extracelularmente y se muestre en la pared celular de la levadura.

- 35 Las formas solubles de los receptores humanos (FcyRIIIA y FcyRIIB) se clonaron. La detección de los dominios Fc de IgG1 en la superficie celular de levadura, sin embargo, se obstaculiza debido a la baja afinidad de FcyR por su ligando. Para evitar esta limitación, se formaron complejos tetraméricos FcyR solubles usando una secuencia AVITAG que se puede biotinilar enzimáticamente y posteriormente reaccionar con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SA-PE; Molecular Probes) para formar complejos tetraméricos FcyR solubles. Los ensayos ELISA confirmaron que los complejos tetraméricos FcyR solubles tuvieron una avidéz más alta para IgG1 humana en relación con la FcyR monomérico. Las proteínas de fusión Fc en la superficie celular de levadura unen además los complejos tetraméricos FcyR solubles tal como se evaluó por análisis de FACS.
- 40

- 45 La unión diferencial de las proteínas Fc fusión expresadas en la superficie celular de levadura con complejos tetraméricos FcyR solubles se monitoreó por un análisis FACS. Las proteínas Fc fusión con afinidades alteradas por uno o más complejos tetraméricos FcyR solubles se identificaron así y se incorporaron después en una inmunoglobulina completa y se expresaron en células de mamífero. El producto expresado en mamífero se usó en ensayos ELISA para confirmar los resultados obtenidos en el sistema de presentación en la superficie de la levadura. Por último, las regiones mutante de Fc se secuenciaron para confirmar el (los) residuo (s) alterado (s).

6.1 Clonación, expresión y purificación de FcyRIIIA

Materiales y Métodos

- 50 FcyRIIB y FcyRIIIA soluble se clonaron como sigue. Los clones ADNc para los genes FcyR humanos (FcyRIIB y FcyRIIIA) se obtuvieron (regalo de Ravetch lab). La región soluble del gen FcyRIIIA (aminoácidos 7- 203) se

amplificó por PCR (Tabla 12), digirió con BamHI/HindIII y se ligó en el vector pET25 (Novagen.) Este vector se digirió con SalI/NotI y se aisló por gel un fragmento 370. El vector hu3A, (regalo de J. Ravetch) se digirió con BamHI/SalI y se aisló un fragmento 270 que contiene el N-terminal de FcγRIIIA. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 cortado con BamH/NotI para crear pcDNA3-FcγRIIIA (aminoácidos 1- 203). La región soluble de FcγRIIB (aminoácidos 33-180) se amplificó por PCR (Tabla 12), digirió con BglII/HindIII y se ligó en pET25b (+) (Novagen). Este vector se digirió con BamHI/NotI y se aisló por gel un fragmento de 140 pb . El vector huRIIB1 (regalo de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI y se aisló un fragmento de 440 pb N-terminal FcγRIIB. Ambos de estos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 cortado con BamHI/ NotI para crear pcDNA3-FcγRIIB (aminoácidos 1-180). Los clones recombinantes se transfectaron en células 293H, los sobrenadantes se recogieron a partir de cultivos celulares, y las proteínas FcγR (rFcγR) recombinantes solubles se purificaron en una columna de sefarosa IgG.

Resultados

FcγRIIIA recombinante soluble (r-FcγRIIIA) y FcγRIIB recombinante soluble (r-FcγRIIB) se purificaron hasta homogeneidad

Posterior a la expresión y purificación de las proteínas FcγR recombinantes solubles en una columna de sefarosa IgG, la pureza y el peso molecular aparente de las proteínas recombinantes del receptor soluble purificadas se determinaron por SDS-PAGE. Como se muestra en la Fig. 3, rFcγRIIIA soluble (Fig. 3, carril 1) tuvo el peso molecular aparente esperado de ~35KDa y rFcγRIIB soluble (Fig. 3, carril 4) tuvo el peso molecular aparente esperado de ~20KDa. Como se muestra en la Fig. 3, rFcγRIIIA soluble migra como una banda difusa "borrosa" a la que ha sido atribuida alto grado de glicosilación que normalmente se encuentran en FcγRIIIA (Jefferis, y otros, 1995 Immunol Lett. 44, 111-117).

6.1.1 Caracterización de FcγRIIIA soluble recombinante purificado

Materiales y Métodos

El rFcγRIIIA soluble purificado, que se obtuvo como se describió anteriormente, se analizó para la unión directa contra IgG humana monomérica o agregada usando un ensayo ELISA. La placa se recubre con 10 ng de rFcγRIIIA soluble durante toda la noche en 1X PBS. Después de recubrir, la placa se lava tres veces en 1X PBS/0.1 % Tween 20. IgG humano, ya sea IgG monomérico biotinilado o IgG agregado biotinilado, se añade a los pocillos a una concentración que van desde 0.03 mg/mL a 2 mg/mL, y se deja unir a la rFcγRIIIA soluble. La reacción se lleva a cabo por una hora a 37 °C. La placa se lava de nuevo tres veces con 1X PBS/0.1 % Tween 20. La unión de IgG humana soluble a rFcγRIIIA soluble se detecta con el conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano picante monitoreando la absorbancia a 650 nm. La absorbancia a 650nm es proporcional a la IgG agregada unida.

En un experimento ELISA de bloqueo, se monitorea la capacidad de un anticuerpo monoclonal FcγRIIIA, 3G8, un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA (Pharmingen), para bloquear la unión del receptor a la IgG agregada. Las condiciones de lavado e incubación fueron las mismas como se describió anteriormente, excepto que antes de la adición de IgG, se añadió un exceso de 5 veces molar de 3G8 y se dejó incubar durante 30 minutos a 37 °C

Resultados

FcγRIIIA recombinante soluble purificada, se une específicamente a la IgG agregada

La unión directa de FcγRIIIA recombinante soluble purificada a IgG monomérica y agregada se probó usando un ensayo ELISA (Fig. 4). A una concentración de IgG de 2 µg/ml se observó fuerte unión a la IgG agregada. Sin embargo, en una concentración similar, no se detectó unión a la IgG monomérica. La unión a IgG agregada se bloqueó por 3G8, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FcγRIIIA que bloquea el sitio de unión del ligando, indicando que la unión de la IgG agregada es a través del sitio normal de unión del ligando FcγRIIIA (Fig. 4). rFcγRIIB soluble se caracterizó además y mostró unirse a IgG con características similares a las del FcγRIIIA soluble (datos no mostrados).

6.2 Formación de complejos tetraméricos soluble FcγR

Materiales y Métodos

Construcción de los plásmidos para la expresión de FcγRIIIA y FcγRIIB soluble fusionado al péptido AVITAG.

Para generar complejos tetraméricos FcγR solubles, la región soluble del gen FcγRIIIA humano (aminoácidos 7-203) se amplificó por PCR (Tabla 12), digirió con BamHI/HindIII y se ligó en el pET25b (+) (Novagen). Este vector se digirió con Sall/NotI, y un fragmento de 370 pb se aisló por electroforesis en gel de agarosa. El vector hu3A, (regalo de J. Ravetch) se digirió con BamHI/Sall, y se aisló un fragmento de 270 pb que contiene el N-terminal de FcγRIIIA .
 5 Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 (Invitrogen), que se había digerido con BamH/NotI para crear pcDNA3-FcγRIIIA (aminoácidos 1- 203).

La región soluble de FcγRIIB (aminoácidos 33-180) se amplificó por PCR (Tabla I), digirió con BglII/HindIII y ligó en pET25b(+) (Novagen) Este vector se ligó con BamHI/NotI, y un fragmento de 140 pb se aisló por electroforesis en gel de agarosa. El vector huRIIb1 (regalo de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI, y se aisló un fragmento FcγRIIB N-terminal de 440. Ambos de estos fragmentos se co-ligaron en pcDNA3.1, que se había digerido con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcγRIIB (aminoácidos 1-180). Posteriormente, la secuencia del enlazador-AVITAG se fusionó al C-terminal de ambos FcγRIIIA y FcγRIIB. Para generar los constructos FcγRIIIA-enlazador-avitag y FcγRIIB-enlazador-avitag, los constructos pcDNA3.1 FcγRIIIA y FcγRIIB se digirieron con Not I y XbaI (ambos cortados en la secuencia del vector) y se ligó dentro del vector un oligonucleótido de cadena doble de 86 pares de bases consistente en el sitio NotI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3'. Este fragmento de 86 pb se generó hibridando dos oligonucleótidos complementarios inverso 5' fosforilado (que se muestran en la Tabla 12 como iniciadores 5' y 3' enlazador.avitag) con los sitios de restricción ya pre-diseñados para NotI y XbaI. Volúmenes iguales de cada iniciador en 100 ng por μl se mezclaron y el ADN se calentó a 90°C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante una hora para hibridar. Esto creó un fragmento de ADN de cadena doble listo que se
 10
 15
 20 liga a los constructos pcDNA3.1-FcγRIIIA y FcγRIIB digeridos con las enzimas respectivas. Por lo tanto, se construyeron el pcDNA3.1-FcγRIIIA-enlazador AVITAG y pcDNA3.1-FcγRIIB-enlazador-AVITAG.

TABLA 12: INICIADORES USADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES FcγR E IgG

oligómero	Secuencia
5' enlazador.avitag (sec. con núm. de ident.1)	GGCCGCAGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTCTGAACGACATCTT CGAGGCTCAGAAA TCGAATGGCACGAATGAT
3' enlazador.avitag (sec. con núm. de ident. 2)	CTAGATCATTTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCAG AACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGC
FcRIIIA izquierda (sec. con núm. de ident. 3)	G TTG GAT CCT CCA ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT T
FcRIIIA derecha (sec. con núm. de ident. 4)	GAA AAG CTT AAA GAA TGA TGA GAT GGT TGA CAC T
FcRIIBright (sec. con núm. de ident. 5)	GAA GTC GAC AAT GAT CCC CAT TGG TGA AGA G
FcRIIBleft (sec. con núm. de ident. 6)	G TTA GAT CTT GCT GTG CTA TTC CTG GCT CC
IgG1 derecha (sec. con núm. de ident. 7)	ATA GTC GAC CAC TGA TTT ACC CGG AGA
IgG1 izquierda (sec. con núm. de ident. 8)	GGAA TTC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT
mcr025;chl (f') (sec. con núm. de ident. 9)	AAA GGATCC GCG AGC TCA GCC TCC ACC AAG G
H021 (sec. con núm. de ident. 10)	GTCTGCTCGAAGCATTAACC

Biotinilación por BirA

Los receptores Fc solubles (FcγR) fusionados a la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos (Avidity,CO) (Schatz P.J., 1993, Biotechnology, 11:1138-1143) en el C-terminal de la proteína clonada en pcDNA 3.1 se generaron por
 25

transfección transitoria de células 293H usando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA). Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y las proteínas FcR solubles se purificaron pasando los sobrenadantes a través de una columna de sefarosa IgG. La concentración de la proteína de fusión soluble FcR-AVITAG se cuantificó por absorbancia a 280 nm. El AVITAG presente en las proteínas solubles FcR se biotiniló de acuerdo con el protocolo del fabricante (Avidity, CO) con la enzima BirA de *E. coli*, una ligasa de biotina. Una dilución final 1:100 de un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma # de catálogo P8849) y 1 mg/ml de concentración final de Leupeptina (Sigma L-8511) se añadieron a la mezcla para evitar la degradación de las proteínas. La reacción con BirA se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche, después de lo cual la solución se concentró usando un dispositivo de ultrafiltración Biomax-10K (Millipore) por centrifugación a 3500 rpm a 4 °C. La proteína se cargó en una columna FPLC Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech) en Tris-HCl (20 mM, pH 8.0), 50 mM de NaCl para separar el FcYR soluble marcado de la biotina libre.

Determinación del grado de biotinilación por ensayo de cambio de estreptavidina

Aproximadamente 80-85 % de la proteína se biotiniló por la enzima BirA (Avidity, CO). El ensayo de cambio estreptavidina se usó para determinar el grado de biotinilación de la proteína. La proteína biotinilada se incubó con estreptavidina (MW 60,000 Daltons) en diferentes relaciones. La proteína no biotinilada sola y estreptavidina sola se incluyen como controles para determinar el grado de biotinilación. La incubación se lleva a cabo sobre hielo por 2 horas o durante toda la noche a 4°C. Las muestras se analizan en un SDS-PAGE Bis-Tris (Invitrogen, CA) al 4-12 % con agente reductor y sin hervir las muestras. La proteína estreptavidina biotinilada unida migra como una banda de alto peso molecular. El grado de biotinilación se estima por la cantidad de proteína monomérica de la izquierda en la muestra. La ausencia de especies monoméricas de bajo peso molecular y la presencia de un complejo con mayor peso molecular que la estreptavidina sola indica un alto grado de biotinilación.

Formación de complejos tetraméricos FcYR

Se realizó la formación de complejos tetraméricos FcYR de acuerdo con metodologías previamente establecidas para tetrámeros MHC de clase I (Véase Busch, D. H. y otros., 1998 *Immunity* 8:353-362; Altman, J. D. y otros., 1996, *Science* 274: 94-96). La concentración del FcYR monomérico biotinilado se calculó basado en la absorbancia a 280 nm. Una molécula de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (Molecular Probes, OR) tiene la capacidad de unirse a 4 moléculas de biotina. Una relación molar 5:1 de FcYR monomérico biotinilado a SA-PE (5X FcYR monomérico biotinilado:1X SA-PE) se usó para asegurar un exceso de proteína biotinilada. El peso molecular calculado de SA-PE es 300,000 Daltons, por lo tanto 303 ml de una solución de 1 mg/ml de estreptavidina-PE tiene 1 nmol de SA-PE, que se añadió a 5 nmol de proteína. La formación eficiente de proteína tetramérica requiere SA-PE que se añade en incrementos escalonados. Se añadió por adelantado la mitad de la cantidad de SA-PE, y el SA-PE restante se añadió en pequeñas alícuotas cada 20-30 minutos a 4°C en la oscuridad. Los intervalos para la adición del SA-PE restante son flexibles. Después de que la adición de SA-PE se completó, la solución se concentró y cargó sobre una columna de FPLC de exclusión por tamaño como anteriormente en solución salina regulada con fosfato, a pH 7.4. La fracción que eluyó en el volumen vacío con un peso molecular mayor de SA-PE solo se recogió. Los inhibidores de proteasa se suplementaron para evitar la degradación de proteínas. La solución se concentró y los inhibidores de proteasa adicionales se añadieron al complejo final para el almacenamiento. La concentración final del complejo tetramérico FcYR soluble se calculó basado en la concentración inicial de la proteína monomérica biotinilada. Por ejemplo, si 500 µg de proteína biotinilada se usó para hacer el complejo tetramérico y los tetrámeros concentrados finales estuvieron en un volumen de 500µl, la concentración se estima que sea aproximadamente 1 mg/mL (Las pérdidas sufridas durante la concentración no se tienen en cuenta, ya que es difícil determinar con precisión la cantidad que se pierde durante cada etapa de la formación de los tetrámeros. Tampoco es posible tomar una absorbancia a 280 nm para medir la concentración debido a la interferencia de la PE). Los complejos tetraméricos solubles FcYR se dispensaron en pequeñas alícuotas a -80 °C para el almacenamiento a largo plazo con los inhibidores de proteasa. Como los tetrámeros se usaron para el tamizaje de una genoteca de presentación de la levadura no se agregó acida sódica a estas preparaciones. Al descongelar una alícuota, los tetrámeros se almacenaron a 4°C hasta un máximo de 1 semana.

Ensayo ELISA para caracterizar los Complejos Tetraméricos FcYR

Un ELISA se usó para caracterizar los complejos tetraméricos FcYR. Una placa de 96 pocillos Maxisorb F (Nunc) se recubrió con 25 ng de IgG humana en tampón PBS, y se incubó durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS/0.5 % de BSA/0.1 % de Tween 20 (tampón de lavado y diluyente) antes de añadir la combinación de tetrámeros FcYRIIIA y los anticuerpos de prueba para determinar el bloqueo con 3G8, un anticuerpo de ratón anti-FcYRIIIA humana como se describe más abajo: se realizó la etapa de bloqueo como sigue: tetrámeros FcYRIIIA soluble a una concentración final fijada de 0.5 mg/ml se preincubaron con anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente en tampón, PBS/0.5 % de BSA/0.1 % de Tween 20. Las concentraciones finales de los anticuerpos se extendieron de 60 mg/mL a 0.25 mg/mL. 3G8 es un anticuerpo de ratón anti-FcYRIIIA humana, y para el propósito de

este experimento, se usó una versión quimérica, es decir, la región variable del anticuerpo es una de ratón anti-FcγRIIIA y la región constante de la cadenas pesada y ligera es de la región de IgG1 humana. Un quimérico 4.4.20. D265A se usó además en este experimento, que es un anticuerpo anti-fluoresceína, de manera que la región Fc contiene una mutación en la posición 265, donde un ácido aspártico se sustituye con alanina en la IgG1 humana, lo que resulta en una unión reducida a FcγR. Este anticuerpo se ha caracterizado previamente (Véase Clynes y otros., 2000, Nat. Med. 6: 443-446; Shields y otros., 2001, J. Biol. Chem., 276: 6591-6604). Este anticuerpo se usó como control negativo de isotipo.

Los anticuerpos se dejaron unir a tetrámeros FcγRIIIA, por preincubación durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se añadió después a la IgG en la placa lavada y se incubó durante y hora adicional a temperatura ambiente. La placa se lavó con tampón y se añadió DJ130c (un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA humano disponible en DAKO, Dinamarca; su epítipo es distinto de ese del anticuerpo 3G8) a dilución 1:5000 y se dejó incubar durante 1 hr a temperatura ambiente para detectar los tetrámeros FcγRIIIA unidos. Los anticuerpos no unidos se lavaron con tampón y el DJ130c unido se detectó con anti-ratón peroxidasa en cabra (Jackson laboratories). Este reactivo no detectará la Fc humana. Después de lavar el anticuerpo no unido conjugado con peroxidasa, el sustrato, reactivo TMB (BioFX), se añadió para detectar el grado de bloqueo con 3G8 contra el control de isotipo y el color desarrollado se leyó a 650 nm.

Para la unión directa de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG por ELISA, placas maxisorb se recubrieron con 25 ng de IgG como se describió anteriormente. Los FcγRIIIA tetraméricos solubles se añadieron de 20 mg/mL a 0.1 mg/mL y FcγRIIIA tetramérico monomérico biotilado soluble se añadieron a concentraciones que van desde 20 mg/mL a 0.16 mg/mL. La detección fue la misma como anteriormente con DJ130c, seguido por anticuerpo de cabra anti-ratón-peroxidasa. El color desarrollado con el reactivo TMB y la placa se leyó a 650 nm.

Resultados

El complejo tetramérico soluble FcγRIIIA se une a IgG monomérica humana a través de su sitio normal de unión ligado

Las proteínas de fusiones solubles FcγRIIIA-AVITAG se generaron, aislaron, y analizaron como se describe en la sección de Materiales y Métodos usando un ensayo ELISA y demostraron que tienen propiedades similares como la proteína FcγRIIIA soluble sin AVITAG (datos no mostrados). Las proteínas de fusión se biotilaron, y los complejos tetraméricos se generaron como describió anteriormente.

El complejo tetramérico FcγR soluble se evaluó después por la unión a su ligando, IgG monomérica humana, usando un ensayo ELISA. El análisis por ELISA mostró que los complejos FcγR tetraméricos solubles unen IgG monomérica humana específicamente Como se muestra en la Fig. 5A, la unión de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG monomérica humana se bloquea por 3G8, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FcγRIIIA humana, tal como se monitoreó por la absorbancia a 650 nm. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que alberga la mutación D265A no fue capaz de bloquear la unión de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG monomérica humana (Fig. 5A). Este experimento confirma así que la unión del complejo FcγRIIIA tetramérico soluble se produce a través del sitio de unión del ligando nativo.

El complejo FcγRIIIA tetramérico soluble se une a IgG humana monomérica con una mayor avidéz que FcγRIIIA monomérico soluble

La unión directa de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana agregada se evaluó usando un ensayo ELISA y se comparó con la unión directa de FcγRIIIA monomérico soluble a IgG humana monomérica. Como se muestra en la Fig. 5B, FcγRIIIA tetramérico soluble se une a IgG humana con una avidéz más alta (8-10 veces) que el receptor monomérico soluble, como se monitoreó por la absorbancia a 450 nm.

La unión del complejo tetramérico FcγRIIIA soluble se ensayó además usando perlas magnéticas recubiertas con fragmento Fc purificado de IgG1 (Fig. 5). El complejo tetramérico FcγRIIIA soluble se une a las perlas recubiertas con Fc de IgG1, bajo condiciones en las que no se detecta la unión del monómero. La especificidad de la unión se demostró pre-incubando el complejo receptor, con un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA, LNK16, que bloquea la unión Fc. Este ensayo confirma, además, que el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble se une a IgG monomérica a través de su sitio normal de unión a ligando, y la avidéz del receptor se aumenta debido a múltiples sitios de unión dentro del complejo.

6.3 Construcción de la cepa de levadura para presentación de dominios mutantes Fc de IgG1

Materiales y Métodos

- 5 El vector pYD1 (Invitrogen) se deriva directamente de un vector replicante de levadura, pCT302 (Shusta, y otros., 2000 Nat. Biotechnol. 18: 754-759, que se ha usado con éxito para presentar los receptores de células T y un número de scFVs. Este plásmido es centromérico y alberga el gen TRP1 que permite un número de copias relativamente constante de 1-2 plásmidos por célula en una cepa de levadura trpl. La clonación direccional en el polienlazador coloca el gen de interés bajo el control del promotor GAL1 y en marco con AGA2. La fusión del dominio Fc de IgG a la levadura Aga2p resulta en la secreción extracelular de la proteína de fusión Aga2-Fc y posteriormente la presentación de la proteína Fc en la pared celular a través de la unión disulfuro a la proteína Aga lp de levadura, que es una proteína integral de la pared celular.
- 10 Para optimizar los niveles de presentación, los diferentes fragmentos de la cadena pesada de IgG1 se amplificaron por PCR y clonaron en pYD1. Específicamente, la región Fc de la cadena pesada de IgG1 (Alotipo IG1m (a); aminoácidos 206-447) se amplificó por PCR (Tabla 1) a partir del clon IMAGEN 182740, digirió con EcoRI/Sall y se ligó en el vector pYD1 (Invitrogen). El clon inicial de IMAGE contuvo una delección de un solo nucleótido en la posición 319 que se corrigió por mutagénesis sitio dirigida in vitro para construir pYD-GIF206 (Quickchange, Stratagene).

15 El fragmento CH1-CH3 (aminoácidos 118-447) se amplificó a partir del clon de cadena pesada del MAb B6.2 en el vector pCINEO usando un oligo 5' (mcr025; chl(f)) y un oligo 3' (H021) (Véase Tabla 8). El fragmento se digirió con BamHI/NotI y ligó en el vector pYD1 para construir pYD-CH1.

- 20 La Fig. 7, muestra una presentación esquemática de los constructos. El constructo CH1-CH3 contiene el dominio CH1 adicionalmente a los dominios bisagra-CH2-CH3 de la cadena pesada, GIF206 contiene 6 residuos de aminoácidos corriente arriba de la bisagra y GIF227 comienza dentro de la región bisagra en un sitio de escisión proteolítica endógena (Jendeborg y otros., 1997 J. Immunol. Meth. 201: 25-34).

6.4 Inmunolocalización y caracterización de los dominios Fc en la pared celular de la levadura.

Materiales y Métodos

- 25 Los constructos que contienen las proteínas de fusión Aga2p-Fc y un vector de control, pYDI, carente de cualquier inserto, se transformaron en la cepa de levadura EBY100 (Invitrogen), MATa ura3-52 trpl leu2Δ1 his3Δ200pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL::GAL-AGA1, usando un protocolo de transformación estándar de levadura con acetato de litio (Gietz y otros., 1992 ácido nucleicos Res. 20: 1425) Posteriormente, se seleccionaron prototrofos triptófano en medios definidos. La amplificación de las poblaciones de células independientes y la inducción de Agalp y proteínas de fusión Aga2p-Fc se llevaron a cabo por el crecimiento en glucosa, seguido por el crecimiento en medios que contienen galactosa como fuente de carbono primaria durante 24-48 horas a 20°C. El crecimiento en galactosa induce la expresión de las proteínas de fusión Aga2-Fc a través del promotor GAL1, que posteriormente conduce a la presentación de proteínas de fusión Fc en la superficie celular de levadura.
- 30

Resultados

- 35 Análisis FACS de las proteínas de fusión Fc

- 40 La expresión de las proteínas de fusión Fc en la superficie celular de levadura se analizó por inmunotinción usando un anticuerpo policlonal F(ab) 2 anti-FcyR humano en cabra conjugado con PE y HP6017 (Sigma) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). La microscopía de fluorescencia muestra la tinción periférica para las tres proteínas de fusión. La cepa de control, que alberga al vector solo, muestra poca o ninguna tinción (datos no mostrados). Se usó un análisis FACS para cuantificar la tinción (Fig. 8). La cepa de levadura que contiene la fusión CH1-CH3 demostró el mayor porcentaje de células teñidas con ambos anticuerpos (Fig. 8B y F). El constructo GIF227 mostró la mayor intensidad de fluorescencia media (Fig. 8, paneles C y G).

Caracterización de la unión de Proteínas Fc de fusión expresada en la superficie celular de levadura

- 45 El contexto natural de las proteínas Fc y FcyR coloca al receptor en la superficie celular y el Fc como el ligando soluble; sin embargo, la presentación en la superficie de levadura Fc invierte la geometría de la interacción natural. La detección de las proteínas Fc de IgG1 en la superficie de la pared celular de levadura se complica tanto por la baja afinidad del FcyR por su ligando como por la geometría inversa inherente en el sistema de presentación. Aunque el último punto no puede alterarse, la avidéz del ligando se mejoró como se explicó anteriormente por la

formación de complejos tetraméricos FcγR solubles, que permiten la detección de la unión FcγR a las proteínas Fc de fusión expresadas en la pared celular de la superficie de la levadura .

5 Para caracterizar la unión de los complejos tetraméricos FcγR solubles a las proteínas de fusión Fc presentadas en la superficie, células de levadura que expresan diferentes constructos Fc se incubaron con los complejos tetraméricos rFcγRIIIA solubles y analizaron por FACS. Las células de levadura que albergan pYD-CH1, que presentan el constructo silvestre CH1-CH3 se unieron por el complejo tetramérico rFcγRIIIA soluble como se muestra por análisis de FACS. Las cepas GIF206 y GIF227, sin embargo, mostraron poca o ninguna unión al complejo tetramérico a rFcγRIIIA soluble como se muestra por análisis de FACS (datos no mostrados).

10 Las mutaciones en la región Fc que bloquean la unión a los FcγRs se han identificado (Shields y otros., 2001; J Biol.Chem. 276: 6591-6604). Una de estas mutaciones, D265A, se incorporó en pYD-CH1 y este mutante se expresó en la superficie celular de la levadura. Estas células se incubaron con el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble usando una alta concentración de ligando (0.15 mM de Fc; 7.5 mM de D265A) El análisis FACS indicó que el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble se unió a su Fc silvestre (Fig. 9A) pero el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble no se unió al mutante D265A -Fc indicando que FcγR está interactuando con el sitio de unión normal de FcR en la región inferior bisagra-CH2 (Fig. 9B).

15 Los anticuerpos contra el sitio de unión del ligando FcγRIIIA bloquearon la unión del complejo tetramérico FcγRIIIA soluble a la proteína Fc silvestre presentados en la pared de la superficie celular de levadura, como se analizó por FACS (Fig. 10). La unión de complejo tetramérico FcγRIIIA soluble se bloqueó por el anticuerpo 3G8, así como el anticuerpo LNK16, otro anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA (Advanced Immunological) (Tam y otros., 1996 J. Immunol. 157:, 1576-1581) y no se bloqueó por un control de isotipo irrelevante. Por lo tanto, la unión del complejo tetramérico FcγRIIIA soluble a las proteínas Fc presentadas en la superficie celular de la levadura se produce a través del sitio normal de unión al ligando. La unión limitada del complejo tetramérico FcγRIIIA indica que una subpoblación de células tiene un Fc correctamente plegado que es accesible a FcγR. Existen numerosas razones por las cuales solamente una subpoblación de células puede ser capaz de unirse al ligando, por ejemplo, pueden estar en diferentes etapas del ciclo celular o las proteínas de fusión pudieran no haberse exportado.

20 Para determinar la constante de disociación de la unión FcγRIIIA-tetramero unido a las proteínas de fusión Fc en la superficie celular de levadura, se analizó usando FACS la unión de una variedad de complejo tetramérico FcγRIIIA. El complejo tetramérico FcγRIIIA se tituló en concentraciones de 1.4 μM a 0.0006 μM. Usando la intensidad media de fluorescencia como una medida de la afinidad de la unión y el análisis de regresión no lineal, la KD se determinó es 0.006 μM (+/- 0.001) (datos no mostrados).

6.5 Construcción de genoteca del mutante de Fc

25 Una genoteca de mutante de Fc se construyó usando iniciadores que flanquean el fragmento Fc en el constructo Fc-CH1 y PCR propenso a errores (Genomorph, Stratagene). El inserto CH1-CH3 en el vector pYD-CHI se amplificó usando un PCR mutagénico (Genomorph, Stratagene). Cinco reacciones se llevaron a cabo usando iniciadores pYD-corriente arriba y pYD-corriente abajo (Invitrogen). El fragmento amplificado resultante se digirió con XhoI/BamHI y se ligó en pYD1. La reacción de ligando se transformó después en células XL10 ultracompetente (Stratagene), lo que resultó en ~1 x 10⁶ transformantes, con 80 % de transformantes que contienen los insertos.

40 El análisis de la secuencia de 28 plásmidos al azar de la genoteca indicó una frecuencia de mutación de ~2-3 mutaciones/kb con una interrupción de 40 % de los cambios de nucleótidos conservados y 60 % de las mutaciones que resultan en cambios de aminoácidos.

La genoteca se transformó en la cepa de levadura EBY100, MATα ura3-52 top I leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can I GAL GAL-AGA 1::URA3 con una alta eficiencia, ~3.3 x 10⁵ transformantes/ug, en 30 reacciones de transformación independientes para crear un total de ~10⁷ transformantes de levadura (Gietz, y otros., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 1425). La genoteca se mezcló y se amplificó por crecimiento en glucosa.

45 6.6 Selección y análisis de mutantes Fc

Materiales y Métodos

Análisis ELISA para el tamizaje de mutantes Fc

Las placas ELISA (Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate) se recubrieron con 50 ml/pocillo de 0.5 mg/ml de BSA-FITC en tampón carbonato a 4 °C, y se dejaron incubar durante toda la noche. Las placas se lavaron con 1X PBS/0.1

5 %Tween 20 (PBST) 3 veces. Se añadieron 200 ml/pocillo de PBST/0.5 %BSA y las placas se incubaron por 30 mins a temperatura ambiente. Las placas se lavaron adicionalmente tres veces con PBST. 50 ml/pocillo de anticuerpo 4-4-20 diluido 1:4 (aproximadamente 3 mg/ml que se lleva a una concentración final de 0.7-0.8 mg/pocillo), ya sea de mutante silvestre o que contiene un Fc, se añadió a partir de medio condicionado en PBST/0.5 % de BSA y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. FcyRIIIA monomérico biotinilado purificado a 3 mg/ml (en PBST/0.5 % de BSA) se añadió (50 µl/pocillo) a las placas y se dejó incubar durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. 50 ml/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina-HRP (Pharmacia, RPN 123V) en PBST/0.5 % de BSA se añadió y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. 80 ml/pocillo de reactivo TMB (BioFX) se añadió después a las placas, y se dejó incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Las reacciones se detuvieron finalmente al añadir 40 ml/pocillo de solución de parada (0.18 M de ácido sulfúrico). Las placas se monitorearon después para determinar la absorbancia a 450 nm. Después del primer tamiz, los candidatos interesantes se confirmaron además por titulación en serie de los mutantes 4-4-20-Fc en ELISA de unión basado en inmuno-complejo. Se realizaron algunas modificaciones en este ELISA. Se usó para recubrir las placas 2 mg/ml BSA-FITC. Basándose en los resultados de cuantificación de IgG, 4-4-20Fc diluido (silvestre o mutantes) a partir de medio condicionado se añadió a una concentración final de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, y 0 mg/ml en PBST/0.5 % BSA.

El tamizaje FACS de la superficie celular presentó las proteínas Fc

20 Las células se cultivaron en al menos 10 mls de HSM-Trp-Ura pH 5.5 con glucosa por 16-24 hrs o hasta que la OD600 fue mayor que 2.0. Las células se centrifugaron a ~2000 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en un volumen igual de HSM-Trp-Ura, pH 7.0 con galactosa. En un frasco de 125 ml, se añadió 36 mls de medio de galactosa, e inoculó con 9 mls de cultivo, el cual se incubó a 20°C con agitación durante 24-48 horas. El crecimiento se monitoreó por la medición de OD600 a intervalos de 8-16 hr. Las células se cosecharon a 2K rpm durante 5 minutos, y se resuspendieron en un volumen igual de 1XPBS, pH 7.4.

25 Tamiz de equilibrio: Una cantidad adecuado de células se incubó mientras que se mantiene un exceso de ligando. Por ejemplo, se prefiere comenzar con un número de células necesarias para garantizar 10 veces la cobertura de la genoteca. Para la primera clasificación con una genoteca que contiene 10^7 transformantes, se deben usar 10^8 células. De hecho lo mejor es iniciar con 10^9 células para compensar la pérdida durante el protocolo de tinción.

30 La incubación se realizó típicamente en un tubo de 1.5 ml en volúmenes de 20-100 mls durante 1 hora a 4 °C en la oscuridad en un agitador rotatorio (tampón de incubación: 1XPBS pH7.4;1 mg/ml BSA). Las células se lavaron una vez en 500 ml de tampón de incubación y centrifugaron a 4K rpm durante 2.5 minutos. Las células se resuspendieron en 100 ml de tampón de incubación y se incubaron con el segundo reactivo de tinción. Para un Fc-CH1, un anticuerpo F(ab)2 anti-hFc F(ab) 2-FITC en cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) se puede usar para la tinción de la expresión de CH1. La tinción se realizó con 1 mL durante 30 minutos. Las células se lavaron además en 500 mL de tampón de incubación y centrifugaron a 4K rpm durante 2.5 minutos, se resuspendieron en 1 mL de IX PBS 1 mg/ml de BSA y analizaron por FACS.

Las puertas de clasificación del tamiz del equilibrio típico y el número de células obtenidas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Puertas de clasificación y número de células clasificadas

Clasificación	GATE	Total de células tamizadas	células recogidas
1 ^{ra}	5 %	10^8	5×10^6
2 ^{da}	1 %	10^7	1×10^5
3 ^a	0.2 %	10^7	2×10^4
4 ^a	0.2 %	10^7	2×10^4

40 Después de la 3ra y 4ta clasificación, las células se sembraron directamente en placas -trp-ura para identificar los mutantes individuales. Esto típicamente recuperó ~200-400 colonias por placa. Después de la recogida de las células se colocaron en 10 mls de medio de glucosa en un tubo cónico de 50 mL y se cultivaron a 30°C. El procedimiento completo se repitió iterativamente.

45 Resultados

Análisis FACS de los mutantes Fc

- Después de la inducción en los medios de galactosa, las células se cosecharon y co-tiñeron con el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble -marcado con PE y F(ab₂) de ratón anti-Fc humano -marcado con FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Las células se analizaron por FACS y las puertas de clasificación se usaron para seleccionar las células que mostraron la más alta afinidad por el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble en relación con la cantidad de expresión Fc en la superficie celular (Fig. 11). Por ejemplo, una célula que contiene un mutante de Fc que se une mejor al complejo tetramérico FcγRIIIA soluble puede expresar proteínas de fusión Fc en la superficie celular de levadura, y esta célula estará en la esquina inferior izquierda de la puerta de clasificación.
- 5
- 10 Cuatro clasificaciones consecutivas se realizaron para enriquecer de aquellos mutantes que mostraron la más alta afinidad por el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble. Las puertas para cada clasificación sucesiva fueron 5.5 %, 1 %, 0.2 % y 0.1 %. Después de la última clasificación, las células se sembraron en medios selectivos y se aislaron las colonias individuales. Cada colonia individual representó una población clonal de células que albergan un solo mutante de Fc dentro de la proteína de fusión Aga2-Fc. Inicialmente 32 colonias independientes se recogieron y probaron por FACS para la unión al complejo tetramérico FcγRIIIA soluble (Fig. 12). Dieciocho mutantes mostraron un aumento en la intensidad de unión tal como se midió por el porcentaje de células unidas por el complejo tetramérico FcγRIIIA soluble y la intensidad de fluorescencia media de las células unidas.
- 15

- Las mutaciones que muestran un aumento en la unión a FcγRIIIA se ensayaron además para la unión al complejo tetramérico FcγRIIB soluble (Fig. 12). La mayoría de las mutaciones que conducen a un aumento en la unión al complejo tetramérico FcγRIIIA soluble resulta además en la detección de tinción del complejo tetramérico FcγRIIB (Fig. 12). Basado en datos físicos y genéticos anteriores, algunas mutaciones que aumentan la unión a FcγRIIIA, se esperan que aumenten además la unión a FcγRIIB (Shields y otros., 2001, J Biol.Chem. 276: 6591-6604; Sondermann y otros., 2000, Nature 406: 267-273).
- 20

Análisis de mutantes en un MAb 4-4-20 producido en una línea celular humana.

- 25 El aislamiento y análisis de mutaciones en el sistema de levadura permite la identificación rápida de nuevos alelos mutantes. El uso de un sistema heterólogo para aislar mutaciones puede resultar en la identificación de mutaciones que mejoran la unión a través de una alteración que resulta en el mal plegamiento o alteración en la glicosilación que es específico de la levadura. Para analizar las mutaciones de Fc en una molécula de inmunoglobulina que se produce en células humanas, los mutantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, que contiene la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20, (Kranz y otros., 1982 J.Biol.Chem, 257(12): 6987-6995). Las cadenas pesada mutante 4-4-20 se co-expresaron transitoriamente con los clones de cadena ligera en la línea de células de riñón humano (293H). Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron por ELISA (Fig. 13).
- 30
- 35 De acuerdo con el ensayo ELISA, la mayoría de los mutantes que se identificaron como que tienen una afinidad mejorada para el complejo monomérico FcγRIIIA soluble, en el análisis secundario FACS, se mostró además un aumento en la unión al complejo tetramérico FcγRIIIA soluble cuando está presente en la región Fc del anticuerpo monoclonal 4-4-20 producido en la línea celular humana (Fig. 13A). Dos mutantes, número 16 y número 19, sin embargo, mostraron una disminución en la unión al complejo monomérico FcγRIIIA soluble.
- 40 La Tabla 14, resume las mutaciones que se han identificado y sus correspondientes características de unión a FcγRIIIA y FcγRIIB determinado por ambos ensayos basados en la presentación en levadura y ELISA. En la Tabla 14, los símbolos representan lo siguiente: ● corresponde a un aumento de 1 vez en la afinidad; + corresponde a un aumento de 50 % en la afinidad; - corresponde a una disminución de 1 vez en la afinidad; → corresponde a ningún cambio en la afinidad en comparación con una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre.

TABLA 14: MUTACIONES IDENTIFICADAS Y CARACTERÍSTICAS DE LA UNIÓN

Clon #	Sitios de Mutación	Dominio	IIIA de unión	IIB de unión
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
7	Aga2p-T43I	Nota: Esta es una mutación en Aga2p que mejora la presentación.		Aga2p-T43I
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1, bisagra, CH2, CH3	ningún cambio	-
12	K290E, L142P	CH1, CH2	+	no probado
16	A141V, H268L, K288E, P291S	CH1, CH2	-	no probado
19	L133M, P150Y, K205E, S383N, N384K	CH1, CH2, CH3	-	no probado
21	P396L	CH3	•	•+
25	P396H	CH3	•••	••
6	K392R	CH3	ningún cambio	ningún cambio
15	R301C, M252L, S192T	CH1, CH2	-	no probado
17	N315I	CH2	ningún cambio	no probado
18	S132I	CH1	ningún cambio	no probado
26	A162V	CH1	ningún cambio	no probado
27	V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T	CH1, Ch2	+	+
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	no probado
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1, CH2, CH3	+	ningún cambio

ES 2 579 602 T3

31	K409R, S166N	CH1,CH3	ningún cambio	no probado
20	S408I, V215I, V125I	CH1,bisagra,CH3	+	ningún cambio
24	G385E, P247H	CH2, CH3	●●●	+
16	V379M	CH3	●●	ningún cambio
17	S219Y	Bisagra	●	-
18	V282M	CH2	●	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	ningún cambio
35	D401V	CH3	+	ningún cambio
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	Bisagra	●	ningún cambio
41	K246T, Y319F	CH2	●	ningún cambio
42	F243I, V379L	CH2,CH3	●+	-
43	K334E	CH2	●+	-
44	K246T, P396H	CH2,CH3	●	●●+
45	H268D, E318D	CH2	●+	●●●●●
49	K288N, A330S, P396L	CH2,CH3	●●●●	●●●
50	F243L, R255L, E318K	CH2	●	-
53	K334E, T359N, T366S	CH2,CH3	●	ningún cambio
54	I377F	CH3	●●	+
57	K334I	CH2	●	ningún cambio
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2,CH3	●●	●●
59	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2,CH3	●●	ningún cambio
61	I377F (aislado independiente)	CH3	●●●	●●+
62	P247L	CH2	●●	●●+
64	P217S, A378V, S408R	bisagra, CH3	●●	●●●+
65	P247L, I253N, K334N	CH2	●●●	●●+
66	K288M, K334E	CH2	●●●	-
67	K334E, E380D	CH2,CH3	●●	-
68	P247L (aislado independiente)	CH2	+	●●●
69	T256S, V305I, K334E, N390S	CH2,CH3	●●	ningún cambio
70	K326E	CH2	●●	●●+
71	F372Y	CH3	+	●●●●+
72	K326E (aislado independiente)	CH2	+	●●
74	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2,CH3	●●	ningún cambio
75	K334E (aislado independiente)	CH2	●●+	ningún cambio
76	P396L (aislado independiente)	CH3	●●	ningún cambio
78	K326E (aislado independiente)	CH2	●●	●●+

79	K246I, K334N		CH2	•	****
80	K334E (aislado independiente)		CH2	•	ningún cambio
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L		CH2,CH3	•	ningún cambio
82	K320E, K326E		CH2	•	•
84	H224L		Bisagra	•	*****
87	S375C, P396L		CH3	++	****+
89	E233D, K334E		CH2	++	ningún cambio
91	K334E (aislado independiente)		CH2	•	ningún cambio
92	K334E (aislado independiente)		CH2	•	ningún cambio
94	K334E, T359N, T366S, Q386R		CH2	•	ningún cambio

El análisis de la unión del complejo tetramérico FcγRIIB soluble muestra que 7 de los 8 mutantes que mostraron un aumento en la unión al complejo tetramérico FcγRIIA soluble tuvo además un aumento de la unión al complejo tetramérico FcγRIIB soluble (Fig. 13B). Un mutante, número 8, mostró una disminución en la unión al complejo tetramérico FcγRIIB soluble. Tres de los mutantes no muestran ninguna diferencia en la unión ya sea al complejo tetramérico FcγRIIA soluble o al complejo tetramérico FcγRIIB soluble, posiblemente debido a mutaciones que resultan en alteraciones específicas de la levadura.

6.7 Ensayo de ADCC de mutantes Fc

Preparación de células efectoras: Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purificaron por Ficoll-Paque (Pharmacia, 17-1440-02) centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Paque a partir de sangre humana periférica normal (Biowhittaker/Poietics, 1 W-406). La sangre se envió el mismo día a temperatura ambiente, y diluyó 1:1 en PBS y glucosa (1g/1L) y estratificó sobre Ficoll en tubos cónicos de 15 mL (3 mL de Ficoll; 4 mL de PBS/sangre) o en tubos cónicos de 50 mL (15 mL de Ficoll; 20 mL de PBS/sangre) La centrifugación se realizó a 1500 rpm (400 rcf) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la capa de PBMC (aproximadamente 4-6 mL del tubo cónico de 50 mL) y se diluyó 1:10 en PBS (que no contiene Ca²⁺ o Mg²⁺) en un tubo cónico de 50 mL, y se centrifugó durante unos diez minutos adicionales a 1200 rpm (250 rcf) a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en 10-12 mL de PBS (que no contiene Ca²⁺ o Mg²⁺), se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL, y se centrifugó durante otros 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en un volumen mínimo de medio (1-2 mL) (medios de Isocove de (IMDM) + suero bovino fetal al 10 % (FBS), 4 mM Gln, penicilina/estreptomina (P/S)) El PBMC resuspendido se diluyó hasta el volumen adecuado para el ensayo de ADCC; dos diluciones se realizaron en una placa ELISA de 96 pocillos (Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate). El rendimiento de PBMC fue aproximadamente 3-5x10⁷ células por 40-50 mL de sangre completa.

Preparación de células objetivo: Las células objetivo usadas en el ensayo fueron SK-BR-3 (ATCC número de acceso HTB-30; Trempe y otros., 1976, Cancer Res. 33-41), Raji (ATCC número de acceso CCL-86; Epstein y otros., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-40), células Daudi (número de acceso a ATCC CCL-213; Klein y otros, 1968, Cancer Res. 28: 1300-10) (resuspendidas en 0.5 mL de medios IMDM) y se marcaron con quelato de europio bis (acetoximetil) 2,2 "- 6',2" terpiridina 6,6'. dicarboxilato (reactivo BATDA; reactivo de Perkin Elmer DELFIA; C136-100). Células K562 (número de acceso ATCC CCL-243) se usaron como células de control para la actividad NK. Las células Daudi y Raji se centrifugaron; las células SK-BR-3 se tripsinizaron durante 2-5 minutos a 37°C, 5 % de CO₂ y los medios se neutralizaron antes de ser centrifugados a 200-350 G. El número de células objetivo usadas en los ensayos fue aproximadamente 4-5 x 10⁶ células y no excedieron 5 x 10⁶ ya que la eficiencia del marcaje fue mejor con tan sólo 2x10⁶ células. Una vez que las células se centrifugaron, se aspiró el medio hasta 0.5 mL en tubos de

15 mL Falcon. 2.5 µl de reactivo BATDA se añadió y la mezcla se incubó a 37°C, 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces en 10 mL de PBS y 0.125 mM de sulfipirazol ("SP"; SIGMA S-9509); y dos veces en 10 mL de medio de ensayo (medio celular + 0.125 mM sulfipirazol). Las células se resuspendieron en un medio de ensayo de 1 mL, se contaron y diluyeron.

- 5 Cuando se usaron células SK-BR-3 como células objetivo después del primer lavado PBS/SP, el PBS/SP se aspiró y añadió 500 µg/mL de FITC (PIERCE 461110) en medios IMDM que contienen SP, Gln, y P/S y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células se lavaron dos veces con medios de ensayo; resuspendieron en 1 mL de medios de ensayo, se contaron y diluyeron.

- 10 Oponización del anticuerpo: Una vez que las células objetivo se prepararon como se describió arriba, se opsonizaron con los anticuerpos adecuados. En el caso de Fc variantes, 50 µL de 1x10⁵ células/mL se añadieron a 2x de concentración del anticuerpo que alberga la Fc variante. Las concentraciones finales fueron como sigue: concentración final de Ch-4-4-20 fue 0.5-1 µg/mL; y concentración final de Ch4D5 fue 30 ng/mL-1 ng/ml

- 15 Las células objetivo opsonizadas se añadieron a las células efectoras para producir una relación efectora:objetivo de 75:1 en el caso de los anticuerpos 4-4-20 con las Fc variantes. En el caso de los anticuerpos Ch4D5 con Fc variantes, se lograron relación efectora:objetivo de 50:1 o 75:1. El gradiente eficaz PBMC para el ensayo se extiende de 100:1 a 1:1. La liberación espontánea (SR) se midió por la adición de 100 µL de medios de ensayo a las células; la liberación máxima (MR) se midió por la adición de 4 % de TX-100. Las células se centrifugaron a 200 rpm en una centrífuga Beckman durante 1 minuto a temperatura ambiente a 57 G. Las células se incubaron durante 3-3.5 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 1000 rpm en una centrífuga Beckman (aproximadamente 220xg) durante cinco minutos a 10°C. 20 µl de sobrenadante se recogió; se añadió 200µL de solución Eu y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente a 120 rpm en un agitador rotatorio La fluorescencia se cuantificó en un fluorómetro de tiempo resuelto (Victor 1420, Perkin Elmer)
- 20

Resultados

- 25 Como se describió anteriormente, las regiones Fc variantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero que contiene la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína 4-4-20 (Kranz y otros., 1982 J.Biol.Chem, 257(12): 6987-6995). Las cadenas pesadas de la variante 4-4-20 se coexpresaron transitoriamente con los clones de cadena ligera en la línea de células de riñón humano (293H). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron usando ensayo de ADCC. La Fig.14 muestra que la actividad ADCC de los mutantes es dependiente de la concentración. Como se resume en la Tabla 8, cinco inmunoglobulinas con regiones Fc variantes tuvieron una actividad ADCC mejorada en relación con ch 4-4-20 silvestre. Los cinco mutantes fueron los siguientes: MGFc-27 (G316D, A378V, D399E); MGFc-31 (P247L, N421K); MGFc-10 (K288N, A330S, P396L); MGFc-28 (N315I, V379M, T394M); MGFc-29 (F243I, V379L, G420V).
- 30

Inmunoglobulinas 4-4-20 adicionales con regiones Fc variantes se ensayaron para su actividad ADCC en relación con una inmunoglobulina 4-4-20 con una región Fc silvestre. Estos resultados se resumen en la Tabla 15.

- 35 Los ensayos de ADCC se llevaron a cabo además usando el mismo protocolo descrito anteriormente para el anticuerpo 4-4-20, sin embargo, las regiones Fc variantes se clonaron en un anticuerpo humanizado (Ab4D5) que es específico para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 /neu). En este caso, se usaron células SK-BR-3 como células objetivo que se opsonizaron con un anticuerpo HER2/neu que porta una región Fc variante. HER2/neu se expresa endógenamente por las células SK BR-3 y por lo tanto está presente en la superficie de estas células. La Fig.15 muestra la actividad ADCC de los anticuerpos HER2/neu que portan regiones Fc variantes. La Tabla 16 resume los resultados de la actividad ADCC de los mutantes en el contexto del anticuerpo HER2/neu. La normalización se llevó a cabo por la comparación de la concentración del mutante con el anticuerpo silvestre requerido para un valor específico del porcentaje de la lisis celular.
- 40

- 45 Como se muestra en la Fig. 15A, los mutantes MGFc-5 (V379M), MGFc-9 (P243I, V379L), MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-13 (K334E, T359N, T366S), y MGFc-27 (G316D, A378V, D399E) que se clonaron en el anticuerpo humanizado anti-HER2/neu exhibieron un % más alto de lisis específica de células SK-BR-3 en relación con el anticuerpo silvestre

TABLA 15 SUMARIO DE ACTIVIDAD ADCC DE MUTANTES

Fc Variante			ADCC			
Etiqueta	Ref	Variación de aminoácido	1ug/ml		0.5ug/ml	
			% de lisis específica	Normalizada	% de lisis específica	Normalizado
MGFc-27	2C4	G316D, A378V, D399E	33 %	2.24	22 %	3.60
MGFc-31	3B9	P247L, N421K	30 %	2.05	17 %	2.90
MGFc-10	1E1	K288N, A330S, P396L	24 %	1.66	10 %	1.67
MGFc-28	2C5	N315I, V379M, T394M	20 %	1.37	10 %	1.69
MGFc-29	3D11	F243I, V379L, G420V	20 %	1.35	7 %	1.17
ch4-4-20 (P54008)			15 %	1.00	6 %	1.00
MGFc-35	3D2	R255Q, K326E	11 %	0.79	3 %	0.53
MGFc-36	3D3	K218R, G281D, G385R	10 %	0.67	5 %	0.78
MGFc-30	3A8	F275Y	9 %	0.64	2 %	0.37
MGFc-32	3C8	D280E, S354F, A431D, L441I	9 %	0.62	4 %	0.75
MGFc-33	3C9	K317N, F423delecionadod	3 %	0.18	-1 %	-0.22
MGFc-34	3B10	F241L, E258G	-1 %	-0.08	-4 %	-0.71
MGFc-26		D265A	1 %	0.08	-3 %	-0.45

TABLA 16: SUMARIO DE LOS MUTANTES

Fc Variante	Cambios de aminoácidos	FcR3A, K _o /K _{off}	FcR2B, K _o /K _{off}	unión de IIIA por ELISA	unión de IIB por ELISA	Fagocitosis (mutante/WT)	4-4-20 ADCC (mutante/wt)	Anti-HER2 ADCC (mutante/wt)
silvestre	ninguno	198/0.170	94/0.094	1	1	1	1	1
MGFc 5	V379M	160/0.167	70/0.10	2X	N/C	0.86	2.09	1.77
MGFc 9	P243I, V379L	99.7/0.105	120/0.113	1.5X	reducido	?	2.25	2.04
MGFc 10	K288N, A330S, P396L	128/0.115	33.4/0.050	5X	3X	1.2	2.96	2.50
MGFc 11	F243L, R255L	90/0.075	74.7/0.09	1x	reducido	0.8	2.38	1.00
MGFc13	K334E, T359N, T366S	55.2/0.128	72/0.11	1.5X	N/C	[1.57	3.67
MGFc 14	K288M, K334E	75.4/0.1	95.6/0.089	3X	reducido	[1.74	
MGFc 23	K334E, R292L	70.2/0.105	108/0.107			[2.09	1.6
MGFc 27	G318D, A378V, D399E	72/0.117	46/0.06	1.5X	14X	1.4	3.60	6.88
MGFc 28	N315I, A379M, D399E			1X	9X	1.37	1.69	1.00
MGFc 29	P243I, V379L, G420V	108/0.082	93.4/0.101	2.5X	7X	0.93	1.17	1.00
MGFc 31	P247L, N421K	62/0.108	66/0.065	3X	N/C	1.35	2.90	1.00
MGFc 37	K248M	154/0.175	100/0.091	1.4X	reducido	0.98	3.83	0.67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0.104	50/0.041	4.5X	2.5X	1.4	3.07	2.50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0.198	86/0.074	1.4X	reducido	1.5	4.29	0.50
MGFc 40	K248M	180/0.186	110/0.09	1.4X	reducido	1.14	4.03	
MGFc 41	H268N, P396L	178/0.159	46.6/0.036	2.2X	4.5X	1.96	2.24	0.67
MGFc 43	Y319F, P352L, P396L	125/0.139	55.7/0.041	3.5X	2X	1.58	1.09	

6.8 Análisis de los parámetros cinéticos de los mutantes Fc

Los parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos ch4-4-20 que albergan mutantes de Fc a FcγRIIIA y FcγRIIB se analizaron usando un ensayo BIAcore (BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, Nueva Jersey). El FcγRIIIA usado en este ensayo fue una proteína monomérica soluble, la región extracelular de FcγRIIIA se unió a la secuencia enlazador-AVITAG como se describió en la Sección 6.2 arriba. El FcγRIIB usado en este ensayo fue una proteína dimérica soluble preparada de acuerdo con la metodología descrita en solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/439,709 presentada en Enero 13, 2003, la cual se incorpora en la presente como referencia. En resumen, el FcγRIIB usado fue el dominio extracelular de FcγRIIB fusionado al dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG2 humana.

BSA-FITC (36 µg/mL en 10 mM de tampón acetato a pH 5.0) se inmovilizó sobre una de las cuatro celdas de flujo (celda de flujo 2) de una superficie del chip sensor a través de química de acoplamiento de amina (por modificación de grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de manera que aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) de BSA-FITC se inmovilizó en la superficie. A continuación de esto, los ésteres activos que no reaccionaron se "cubrieron" con una inyección de 1 M Et-NH2. Una vez que se preparó una superficie adecuada, los anticuerpos ch 4-4-20 que portan las mutaciones de Fc se pasaron sobre la superficie por inyecciones de un minuto de una solución 20 µg/mL a una tasa de flujo 5 µL/ml. El nivel de anticuerpos ch-4-4-20 unidos a la superficie se extendieron entre 400 y 700 RU. Luego, diluciones en serie del receptor (proteína de fusión FcγRIIIA and FcγRIIB-Fc) en tampón HBS-P (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl , 0.005 % de tensioactivo P20, 3 mM de EDTA, pH 7.4) se inyectaron

en la superficie a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ La regeneración del anticuerpo entre diferentes diluciones de los receptores se llevó a cabo por inyecciones de 5 segundos individuales de 100 mM NaHCO_3 pH 9.4; 3M NaCl.

Las mismas diluciones del receptor se inyectaron además sobre una superficie BSA-FITC sin ningún anticuerpo ch-4-4-20 al comienzo y al final del ensayo como inyecciones de referencia.

5 Una vez que se recogió un conjunto de datos completo, las curvas de unión resultantes se ajustaron globalmente usando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, Nueva Jersey). Estos algoritmos calculan tanto el K_{on} como K_{off} , a partir de lo que la constante de unión del equilibrio aparente, KD se deduce como la relación de dos constantes de las tasas (es decir, $K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$). Los tratamientos más detallados de cómo las constantes de las tasas individuales se derivan se pueden encontrar en el Manual del Software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey).

10 Las curvas de unión para dos concentraciones diferentes (200 nM y 800 nM para Fc γ RIIIA y 200 nM y 400 nM para la proteína de fusión Fc γ RIIB) se alinearon y las respuestas se ajustaron al mismo nivel de los anticuerpos capturados, y las curvas de referencia se restaron de las curvas experimentales. Las fases de asociación y disociación se ajustaron por separado. La constante de la tasa de disociación se obtuvo para el intervalo de 32-34 segundos de la fase de disociación; el ajuste de la fase de asociación se obtuvo por un modelo de Langmuir 1:1 y el ajuste de la base se seleccionó sobre la base de los criterios R_{max} y χ^2 .

Resultados

La Fig. 16 muestra la captura de los anticuerpos ch-4-4-20 con región mutante de Fc en el chip sensor inmovilizado-BSA-FITC. 6 μL de anticuerpos a una concentración de aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se inyectaron a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ sobre la superficie de BSA-FITC. La fig. 17 es un sensograma de la unión en tiempo real de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes. La unión de Fc γ RIIIA se analizó a la concentración de 200 nM y las respuestas de la señal de resonancia se normalizaron en el nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 silvestre. Los parámetros cinéticos de la unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 se obtuvieron ajustando los datos obtenidos en dos concentraciones diferentes Fc γ RIIIA, 200 y 800 nM (Fig. 18). La línea continua representa el ajuste de la asociación que se obtuvo en base a los valores de K_{off} calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. KD y K_{off} representa la media calculada a partir de dos concentraciones diferentes usadas de Fc γ RIIIA. La Fig. 19 es un sensograma de la unión en tiempo real de la proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 portadores de regiones Fc variantes. La unión de proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc se analizó a 200 nM de concentración y las respuestas de la señal de resonancia se normalizaron a nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-04-04-20 silvestre. Los parámetros cinéticos para la unión de la proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 se obtuvieron ajustando los datos obtenidos en dos diferentes concentraciones de proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc, 200 y 800 nM (Fig. 20). La línea continua representa el ajuste de la asociación que se obtuvo en base a la K_{off} calculada para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. KD y K_{off} representa el promedio de dos concentraciones diferentes usadas de la proteína Fc γ RIIB-Fc.

35 Los parámetros cinéticos (K_{on} y K_{off}) que se determinaron a partir del análisis BIAcore correlacionaron con la característica de unión de los mutantes determinados por un Ensayo ELISA y la actividad funcional de los mutantes determinada en un ensayo de ADCC. Específicamente, como se observa en la Tabla 17, los mutantes que tuvieron una actividad ADCC mejorada en relación con la proteína silvestre, y tuvieron una unión mejorada a Fc γ RIIIA como se determinó por un ensayo de ELISA tuvieron una K_{off} mejorada para Fc γ RIIIA (es decir, una K_{off} inferior). Por lo tanto, un valor de K_{off} inferior de Fc γ RIIIA para una proteína mutante de Fc en una relación con una proteína silvestre puede ser probable que tenga una función de ADCC mejorada. Por otro lado, como se observa en la Tabla 18, los mutantes que tuvieron una actividad ADCC mejorada en relación con la proteína silvestre, y tuvieron una unión reducida para la proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc determinado por Ensayo ELISA tuvieron una K_{off} más alta por una proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc.

45 Así, los valores K_{off} por una Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB se puede usar como medidas de predicción de cómo un mutante se comportará en un ensayo funcional tal como un ensayo de ADCC. De hecho, las relaciones de valores K_{off} por Fc γ RIIIA y proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc de los mutantes de la proteína silvestre se representaron contra los datos de ADCC (Fig. 21). Específicamente, en el caso de los valores K_{off} por un Fc γ RIIIA, la relación de K_{off} (wt)/ K_{off} (mutante) se representó contra los datos de ADCC; y en el caso de los valores K_{off} por un Fc γ RIIB, la relación de K_{off} (mut)/ K_{off} (wt) se representó contra los datos de ADCC;. Números superiores que uno (1) muestran una tasa de disociación disminuida por un Fc γ RIIIA y una tasa de disociación aumentada por un Fc γ RIIB-Fc en relación con el silvestre. Los mutantes que caen dentro de la caja indicada tienen una tasa inferior por una unión a Fc γ RIIIA, y una tasa superior para la unión Fc γ RIIB-Fc, y poseen una función de ADCC mejorada.

TABLA 17 PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UNIÓN DE FCRIIA A CH4-4-20AB OBTENIDO POR "AJUSTE POR SEPARADO" DE LAS CURVAS DE UNIÓN 200 NM Y 800 NM

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K_{on} 1/Ms	K_{off} 1/s	ELISA_OD	ADCC, %
Wt(0225)	319	6.0×10^5	0.170	0.5	17.5
Mut11(0225)	90	8.22×10^5	0.075	0.37	32
Mut5(0225)	214	8.2×10^5	0.172	0.75	28
Mut6(0225)	264	6.67×10^5	0.175	0.6	23
Mut8(0225)	234	8.3×10^5	0.196	0.5	22
Mut10(0225)	128	9.04×10^5	0.115	1.0	41
Mut12(0225)	111	1.04×10^6	0.115	1.0	37
Mut15(0225)	67.9	1.97×10^6	0.133	1.0	15
Mut16(0225)	84.8	1.60×10^6	0.133	1.0	15
Mut18(0225)	92	1.23×10^6	0.112	1.0	28
Mut25(0225)	48.6	2.05×10^6	0.1	1.0	41
Mut14(0225)	75.4	1.37×10^6	0.1	1.1	28
Mut17(0225)	70.5	1.42×10^6	0.1	1.25	30
Mut19(0225)	100	1.20×10^6	0.120	0.75	11
Mut20(0225)	71.5	1.75×10^6	0.126	0.5	10
Mut23(0225)	70.2	1.43×10^6	0.105	1.25	25

Los mutantes marcados no ajustan con el grupo por los datos de ELISA o ADCC.

Tabla 18 Parámetros cinéticos de unión de FcRIIB-Fc a mutante ch4-4-20Ab y silvestre obtenido por "ajuste por separado" de las curvas de unión 200 nM y 800 nM

Los mutantes resaltados no se ajustan al grupo por los datos ELISA o ADCC

TABLA 18. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UNIÓN FCRIIB-FC AL MUTANTECH4-4-20AB SILVESTRE OBTENIDO POR "AJUSTE SEPARADO" DE CURVAS DE UNIÓN 200 NM Y 800 NM

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K _{on} 1/Ms	K _{off} 1/s	ELISA,OD	ADCC, %
Wt(0225)	61.4		0.085	0.4	17.5
Mut11(0225)	82.3		0.1	0.08	32
Mut5(0225)	50		0.057	0.8	26
Mut6(0225)	66.5		0.060	0.35	23
Mut8(0225)	44.2		0.068	0.25	22
Mut10(0225)	41.3		0.05	1.2	41
Mut12(0225)	40.1		0.051	0.4	37
Mut15(0225)	37.8		0.040	1.55	15
Mut16(0225)	40		0.043	1.55	15
Mut18(0225)	51.7		0.043	1.25	28
Mut25(0225)			0.112	0.08	41
Mut14(0225)	95.6		0.089	0.13	28
Mut17(0225)	55.3		0.056	0.38	30
Mut19(0225)	45.3		0.046	1.0	11
Mut20(0225)	24.1		0.028	0.8	10
Mut23(0225)	108		0.107	0.1	25

6.9 Tamizaje de mutantes Fc usando múltiples rondas de enriquecimiento usando un ensayo de fase sólida

5 Los siguientes tamizajes de mutantes se orientaron a identificar conjuntos adicionales de mutantes que muestran una unión mejorada a FcγRIIIA y unión reducida a FcγRIIB. El tamizaje secundario de variantes Fc seleccionadas se realizó por ELISA seguido por pruebas de ADCC en el sistema 4-4-20. Los mutantes se seleccionaron principalmente basado en su capacidad para mediar la ADCC a través de 4-4-20 usando células SK-BR3 recubiertas con fluoresceína como objetivo y aislaron PBMC de donantes humanos como la población de células efectoras. Los mutantes Fc que mostraron un aumento relativo en la ADCC, por ejemplo, un mejoramiento por un factor de 2 se clonó en anti-HER2/neu o anti-CD20 chAbs y probaron en un ensayo de ADCC usando las células tumorales adecuadas como objetivos. Los mutantes se analizaron además por BIACore y se determinaron su K_{off} relativa.

15 Tamiz 1: Reducción secuencial de la fase sólida y selección usando perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB seguido por selección con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIIA. El objetivo de este tamiz fue la identificación de mutantes Fc que ya no se unen más a FcγRIIB o muestran una unión reducida a FcγRIIB. Un exceso de 10 veces de la biblioteca virgen (~10⁷ células) se incubó con perlas magnéticas ("My One", Dynal) recubiertas con el FcγRIIB. Las levaduras unidas a las perlas se separaron de la fracción no unida colocando el tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Esas células de levadura que no se unieron a las perlas se eliminaron y colocaron en medio fresco. Se unieron a las perlas luego que se recubrieron con FcγRIIIA. La levadura unida a las perlas se separó de la fracción no unida colocando el tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Las levaduras no unidas se eliminaron y las células unidas se eliminaron por agitación vigorosa. Las células recuperadas se volvieron a crecer en medios que contienen glucosa y reinducen en medios selectivos que contienen galactosa. El proceso de selección se repitió. El cultivo final se usó para cosechar el ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en 4-4-20. Aproximadamente 90 mutantes de Fc se tamizaron por ELISA 4-4-20 y ensayos de ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 19.

TABLA 19: MUTANTES SELECCIONADOS POR REDUCCIÓN SECUENCIAL DE LA FASE SÓLIDA Y SELECCIÓN USANDO PERLAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON FCYRIIB SEGUIDA POR LA SELECCIÓN CON PERLAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON FCYRIIA.

Mutante	Cambios de aminoácidos
MgFc37	K248M
MgFc38	K392T, P396L
MgFc39	E293V, Q295E, A327T
MgFc41	H268N, P396LN
MgFc43	Y319F, P352L, P396L
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,
MgFc42	G402D

5 Tamiz 2&3: Mutantes seleccionados por FACS, Equilibrio y Tamizaje cinético: El primer tamiz de la genoteca identificó una mutación en la posición 396, cambiando el aminoácido de Prolina a Leucina (P396L) Esta Fc variante mostró una unión aumentada tanto a FcYRIIA como FcYRIIB. Una segunda genoteca se construyó usando P396L como una línea de base. La mutagénesis por PCR se usó para generar $\sim 10^7$ mutantes cada uno de los cuales contuvo la mutación P396L y contuvo cambios de nucleótidos adicionales. La genoteca P396L se tamizó usando dos conjuntos de condiciones.

10 Un tamiz de equilibrio se realizó usando FcYRIIA-enlazador-avitag biotinilado como un monómero, usando métodos ya descritos. Aproximadamente el exceso de 10 veces de genoteca (10^8 células) se incubó en un 0.5 mL de aproximadamente 7 nM de FcYRIIA durante 1 hr. La mezcla se clasificó por FACS, seleccionando el máximo de 1.2 % de aglutinantes. Las células de levadura seleccionadas se cultivaron en medios selectivos que contienen glucosa y reinducen en medios selectivos que contienen galactosa. El tamiz de equilibrio se repitió una segunda vez y la puerta de clasificación se estableció para recoger el máximo de 0.2 % de aglutinantes. Las células de levadura seleccionadas se cultivaron después bajo condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó después para cosechar el ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron por PCR y clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifican el dominio variable 4-4-20 usando métodos ya descritos. Aproximadamente 90 mutantes Fc se tamizaron por ELISA 4-4-20 y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 20.

TABLA 20: MUTANTES SELECCIONADOS POR FACS USANDO UN TAMIZ DE EQUILIBRIO CON CONCENTRACIONES DE FCYRIIA DE APROXIMADAMENTE 7 NM.

Mutante	Cambios de aminoácidos
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L
MgFc44	K334N, P396L
MgFc46	P217S, P396L
MgFc47	K210M, P396L
MgFc48	V379M, P396L
MgFc49	K261N, K210M, P396L
MgFc60	P217S, P396L

20 Se implementó además un tamiz cinético para identificar mutantes con K_{off} mejorada en la unión a FcYRIIA. Las condiciones se establecieron para tamizar la genoteca P396L usando una cepa con la Fc variante P396L que se presenta en la superficie de la levadura. En resumen las células cultivadas bajo condiciones de inducción se incubaron con 0.1 μ M de monómero FcYRIIA-enlazador-avitag biotinilado durante 1 hr. Las células se lavaron para eliminar el ligando marcado. Las células marcadas se incubaron después a diferentes tiempos con 0.1 μ M de monómero FcYRIIA-enlazador-avitag no marcado, se lavó y se tiñeron después con SA:PE para el análisis FACS (Fig. 22). Las células se tiñeron además con anti- Fc humano en cabra para demostrar que la presentación Fc se mantuvo durante el experimento.

25 Basado en el estudio de competencia se determinó que un 1 minuto de incubación resultó en aproximadamente 50 % de pérdida de la tinción de las células. Este intervalo de tiempo se eligió para el tamiz cinético usando la genoteca P396L. Aproximadamente el exceso de 10 veces de genoteca (10^8 células) se incubó con 0.1 μ M de monómero FcYRIIA-enlazador-avitag biotinilado en un volumen de 0.5 mL. Las células se lavaron e incubaron después durante

1 minuto con ligando no marcado. Posteriormente, las células se lavaron y marcaron SA:PE. La mezcla se clasificó por FACS, seleccionando el máximo de 0.3 % de aglutinantes. Las células de levadura seleccionadas se cultivaron en medios selectivos que contienen glucosa y reinducen en medios selectivos que contienen galactosa. El tamiz cinético se repitió una segunda vez y la puerta de clasificación se estableció para recoger el máximo de 0.2 % de aglutinantes. La genoteca P396L no seleccionada se comparó por FACS con las células de levadura seleccionadas para la unión mejorada (Fig. 23). Los histogramas muestran el porcentaje de células que se cotiñen tanto con FcγRIIIA /PE como anti-Fc humana/FITC en cabra (superior derecha)

Las células de levadura seleccionadas de la segunda clasificación se cultivaron después bajo condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó después para cosechar el ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de 4-4-20 usando métodos descritos anteriormente. Aproximadamente 90 mutantes Fc se tamizaron por ELISA 4-4-20 y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 21.

TABLA 21: MUTANTES SELECCIONADOS POR FACS USANDO UN TAMIZ CINÉTICO USANDO CANTIDADES EQUIMOLARES DE CD16A NO MARCADO DURANTE 1 MINUTO.

Mutantes	Cambios de aminoácidos
MgFc50	F247S, P396L
MgFc51	Q419H, P396L
MgFc52	V240A, P396L
MgFc53	L410H, P396L
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
MgFc55	R255I, P396L
MgFc57	L242F, P396L
MgFc59	K370E, P396L

Tamizajes 4 y 5: Combinación de la etapa de reducción de la fase sólida FcγRIIB con la selección de FcγRIIIA por clasificación FACs, usando el alelo FcγRIIIA 158V.

El análisis de las Fc variantes del Tamiz 1 mostró que las mutaciones que se seleccionaron del tamiz secundario tuvieron unión mejorada tanto a FcγRIIIA como FcγRIIB. Por lo tanto, los datos sugieren que la reducción secuencial y selección usando perlas magnéticas (fase sólida), bajo las condiciones establecidas no se seleccionaron de manera eficiente para la unión de FcγRIIIA y FcγRIIB. Por lo tanto, para el tamizaje más eficazmente de mutantes que se unen a FcγRIIIA, mientras que tienen reducida o que no se unen a FcγRIIB, la etapa de reducción de FcγRIIB en la fase sólida se combinó con la selección FcγRIIIA por clasificación FACs. Esta combinación identificó Fc variantes que se unen a FcγRIIIA con mayor o igual afinidad que Fc silvestre.

Un exceso de 10 veces de la genoteca virgen (~10⁷) se incubó con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB. Las levaduras unidas a las perlas se separaron de la fracción no unida colocando el tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Esas células de levadura que no se unieron a las perlas se eliminaron y colocaron en medio fresco y posteriormente se reindujeron en medios que contienen galactosa. La reducción de FcγRIIB por las perlas magnéticas se repitió 5 veces. Se analizó la población resultante de levaduras y se encontró que muestra mayor que 50 % de tinción de células con anti-Fc humano en cabra y un porcentaje muy pequeño de células se tiñeron con la FcγRIIIA. Estas células se seleccionan después dos veces por una clasificación FACS con 0.1 μM de FcγRIIIA enlazador-avitag biotinilado (datos no mostrados). El FcγRIIIA fue el alotipo 158V. Se analizaron las células de levadura tanto para la unión a FcγRIIIA como FcγRIIB después de cada clasificación y se comparó con la unión por el dominio Fc silvestre (Figs. 24 A-B).

Las células de levadura seleccionadas de la segunda clasificación se cultivaron después bajo condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó después para cosechar el ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de 4-4-20. Aproximadamente 90 mutantes Fc se tamizaron por ELISA 4-4-20 y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 22 (mutantes 61-66).

TABLA 22: MUTANTES SELECCIONADOS POR REDUCCIÓN DE PERLAS MAGNÉTICAS USANDO PERLAS RECUBIERTAS CON CD32B Y SELECCIÓN FINAL POR FACS USANDO FCγRIIIA 158VALINA O 158FENILALANINA

Mutantes	Cambios de aminoácidos
MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N381D
MgFc64	E233G
MgFc65	N278Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T

5 Tamizaje de mutantes Fc usando el alelo 158F de FcγRIIIA: Dos alelos diferentes del receptor FcγRIIIA que existen tienen diferentes afinidades de unión para el dominio Fc de IgG1: (Koene y otros, 1997, Blood 90: 1109-1114; Wu y otros, 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70). El alelo 158F se une al dominio Fc con una constante de unión de 5-10 veces menor que el alelo 158V. Anteriormente todos los tamizajes de Fc usando presentación en levadura se realizaron usando el alelo de alta unión 158V como ligando. En este experimento, los mutantes Fc se seleccionaron de la población de levaduras FcγRIIB reducidos usando monómero FcγRIIIA158F-enlazador-avitag biotinilado como un ligando. La puerta de clasificación se ajustó para seleccionar el máximo de 0.25 por ciento de aglutinantes FcγRIIIA 158F. La población enriquecida resultante se analizó por FACS (Fig. 24B). Los clones individuales se aislaron después y su unión a diferentes FcγRs se analizaron por FACS (Fig. 24B). El análisis de los clones individuales de la población resultó en la identificación de un único mutante que alberga 5 mutaciones MgFc67 (V284M, S298N, K334E, R355W, R416S), que tuvo una unión mejorada a FcγRIIIA y una unión reducida a FcγRIIB.

Tamiz Secundario de Mutantes por un ensayo de ADCC para los Tamizajes 1, 2 y 3:

15 Los mutantes que se seleccionaron en los tamizajes anteriores se analizaron usando un ensayo de ADCC estándar para determinar las tasas relativas de lisis mediada por ch4-4-20 que albergan los mutantes Fc. Los anticuerpos ch4-4-20 que portan las Fc variantes se construyeron usando métodos ya descritos anteriormente. Se usaron células SK-BR3 como objetivos y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron de donantes usando un gradiente de Ficoll, como se describió arriba (sección 6.7). Los resultados de la actividad ADCC para los mutantes se resumen en la Tabla 23.

20 Como se observa en la Tabla 23, los mutantes aislados usando los tamizajes primario y secundario anteriores basados en la reducción de FcγRIIB y selección de FcγRIIA mostraron actividad ADCC mejorada en relación con el silvestre.

TABLA 23: ANÁLISIS DE ADCC MEDIADA POR EL ANTICUERPO ANTI-FLUORESCÉINA 4-4-20 EN CÉLULAS SKBR3 RECUBIERTAS CON FLUORESCÉINA .

Mutante	Cambios de aminoácidos	Tasa relativa de lisis
MgFc37	K248M	3.83
MgFc38	K392T, P396L	3.07
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4.29
MgFc41	H288N, P396LN	2.24
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.09
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	3.17
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	3.3
MgFc44	K334N, P396L	2.43
MgFc46	P217S, P396L	2.04
MgFc47	K210M, P396L	2.02
MgFc48	V379M, P396L	2.01
MgFc49	K261N, K210M, P396L	2.06
MgFc50	P247S, P396L	2.1
MgFc51	Q419H, P396L	2.24
MgFc52	V240A, P396L	2.35
MgFc53	L410H, P396L	2
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	3.59
MgFc55	R255I, P396L	2.79
MgFc57	L242F, P396L	2.4
MgFc59	K370E, P396L	2.47
MgFc60	P217S, P396L	1.44

Los mutantes 37, 38, 39, 41, 43 se analizaron usando 0.5 µg/ml de ch4-4-20. Todos los otros anticuerpos se probaron a 1 µg/ml. Todas las tasas se normalizaron con ch4-4-20 (IgG1) silvestre.

5 Los mutantes se clonaron adicionalmente en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antitumoral 4D5 (anti-HER2/neu) y el anticuerpo monoclonal 2H7 anti-CD20 por la sustitución del dominio Fc de esos anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron y purificaron y probaron en un ensayo de ADCC usando métodos estándar mediante transfección transitoria en células 293H y purificación en una columna de proteína G. Los anticuerpos quiméricos 4D5 se probaron en un ensayo de ADCC usando como objetivos células SK-BR3 (Fig. 25), mientras los anticuerpos quiméricos 2H7 se probaron en un ensayo de ADCC usando células Daudi como objetivos (Fig. 26).

10 Tamiz Secundario de Mutantes a través de BIAcore: Los mutantes que se seleccionaron en los tamizajes anteriores se analizaron después por BIAcore para determinar los parámetros cinéticos para la unión a FcγRIIIA(158V) y FcγRIIB. El método usado fue similar al descrito en la Sección 6.8, arriba.

15 Los datos presentados son valores Koff en relación con las tasas del silvestre determinado a partir de experimentos usando los mutantes Fc en el anticuerpo monoclonal ch4-4-20. Los números relativos mayores que uno indican una disminución de la tasa K_{off}. Números menores que uno indican un aumento en la tasa.

20 Los mutantes que mostraron disminución en las tasas por una FcγRIIIA fueron MgFc38 (K392, P396L), MgFc43(Y319F, P352L, P396L), MgFc42(D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D), MgFc43b (K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44 (K334N, P396L), MgFc46 (P217S, P396L), MgFc49 (K261N, K210M, P396L). Los mutantes que mostraron disminución en las tasas por una FcγRIIB fueron, MgFc38(K392, P396L), MgFc39 (E293V, Q295E, A327T), MgFc43 (K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44 (K334N, P396L). Los datos de Biacore se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24: Datos BIAcore.

Fc mutante	Residuos AA	FcγRIIIA158V (Koff WT/ Mut)	FcγRIIB (Koff WT/ Mut)
MgFc37	K248M	0.977	1.03
MgFc38	K392T, P396L	1.64	2.3
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	0.86	1.3
MgFc41	H268N, P396LN	0.92	1.04
MgFc43	Y319F, P352L, P396L D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,	1.23	2.29
MgFc42	G402D	1.38	
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	1.27	0.89
MgFc44	K334N, P396L	1.27	1.33
MgFc46	P217S, P396L	1.17	0.95
MgFc47	K210M, P396L		
MgFc48	V379M, P396L		
MgFc49	K281N, K210M, P396L	1.29	0.85
MgFc50	P247S, P396L		
MgFc51	Q419H, P396L		
MgFc52	V240A, P396L		
MgFc53	L410H, P396L		
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L		
MgFc55	R255I, P396L		
MgFc57	L242F, P396L		
MgFc59	K370E, P396L		
MgFc60	P217S, P396L		
MgFc61	A330V	1	0.61
MgFc62	R292G	1	0.67
MgFc63	S298N, K360R, N361D	1	0.67
MgFc64	E233G	1	0.54
MgFc65	N276Y	1	0.64
MgFc66	A330V, G427M,	1	0.62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T		

6.10 Ensayos de ADCC mediada por PBMC

Materiales y Métodos

5 Las Fc variantes que muestran unión mejorada a FcγRIIIA se probaron por ADCC basado en PBMC usando relación de 60:1 efectora:objetivo: Dos sistemas de modelos tumorales diferentes se usaron como objetivos, SK-BR3 (anti-HER2/neu) y Daudi (anti-CD20). El porcentaje específico de lisis se cuantificó para cada mutante. El análisis de regresión lineal se usó para representar el ajuste de los datos al máximo porcentaje de lisis a 100 %.

10 La ADCC se activa en células efectoras del sistema inmunológico a través de una vía de transducción de la señal que se desencadena por una interacción entre FcγR de baja afinidad y un complejo inmune. Las poblaciones de células efectoras se derivaron ya sea de sangre primaria o macrófagos derivados de monocitos activados (MDM). Las células objetivo se cargaron con europio e incubaron con MAb quimérico y posteriormente se incubaron con poblaciones de células efectoras. El europio trabaja de la misma forma que el 51Cr, pero no es radiactivo y el europio liberado se detecta en un lector de placa fluorescente. Los linfocitos cosechados a partir de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) contienen principalmente células asesinas naturales (NK). La mayoría de la actividad ADCC ocurrirá a través de la NK que contiene FcγRIIIA pero no FcγRIIB en su superficie.

15

Los experimentos se realizaron usando dos poblaciones diferentes de células objetivo, SK-BR-3 y Daudi, que expresan HER2/neu y CD20, respectivamente. Los ensayos de ADCC se establecieron usando SK-BR-3 recubiertas con Ch4-4-20/FITC, Ch4D5/SKBR3, y Rituxan/Daudi (datos no mostrados). Los MAbs quiméricos se modificaron usando mutaciones Fc identificadas. Los mutantes Fc se clonaron en Ch4D5. El Ab purificado se usó para opsonizar células SK-BR -3 o células Daudi. Los mutantes Fc se clonaron en Ch4D5.

Resultados. Los mutantes Fc mostraron una actividad ADCC mediada por PBMC mejorada en las células SK BR3 (Fig. 29). El gráfico muestra el análisis de regresión lineal de un ensayo de ADCC estándar. El anticuerpo se tituló más de 3 logs usando una relación efectora a objetivo de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR)/(MR-SR)* 100 .

Los mutantes Fc mostraron actividad ADCC mediada por PBMC mejorada en células Daudi (Fig. 30).

6.11 Ensayos ADCC basados en macrófagos derivados de monocitos (MDM)

La destrucción de células tumorales dependientes de FcγR se media por macrófagos y células NK en modelos tumorales de ratón (Clynes y otros., 1998, PNAS Estados Unidos, 95: 652-6). Los monocitos elutriados de donantes se usaron como células efectoras para analizar la eficiencia de los mutantes Fc para desencadenar la citotoxicidad celular de las células objetivo en ensayos de ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγR3A, y FcγR2B se afectan por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR a partir de monocitos congelados cultivados en medios que contienen diferentes combinaciones de citoquinas y suero humano se examinaron por FACS usando MAbs específicos a FcR. (Fig. 31). Las células cultivadas se tiñeron con anticuerpos específicos a FcγR y analizaron por FACS para determinar los perfiles FcγR de MDM. Las condiciones que mejor imitan la expresión de FcγR in vivo en los macrófagos, es decir., que mostraron la mayor fracción de células que expresan CD 16 y CD32B se usaron en un ensayo de ADCC basado en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Para el experimento en la Fig. 31, los monocitos elutriados congelados se cultivaron durante 8 días en DMEM y 20 % de FBS que contiene ya sea M-CSF (condición 1) o GM-CSF (condición 2). Para el experimento en la Fig. 32, los monocitos elutriados congelados se cultivaron durante 2 días en DMEM y 20 % de FBS que contiene GM-CSF, IL-2 e IFNγ antes del ensayo de ADCC. Condiciones libres de suero se desarrollaron que permiten altos niveles de expresión de CD16 y CD32B (datos no mostrados). En resumen, los monocitos purificados se crecieron durante 6-8 días en Macrófago-SFM (Invitrogen) que contiene GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-10, e IL-1β. Mientras la incidencia de las células CD32B+/CD16+ en estos cultivos es más alta usando una mezcla de citoquinas, las combinaciones de dos de más citoquinas mejorarán además la expresión de FcγR (M-CSF/IL-6, M-CSF/IL-10, o M-CSF/IL-1β. Para los ensayos de ADCC, se añade IFNγ para las 24-48 horas finales.

ADCC basado en MDM requiere tiempos de incubación >16 hrs para observar la destrucción de la célula objetivo. Las células objetivo se cargaron con Indio-111 que se retiene para incubaciones largas dentro de las células objetivo. La liberación de indio se cuantificó usando un contador gamma. Todos los demás reactivos, Abs y células objetivo, fueron similares al ensayo de ADCC basado en PBMC. La actividad debido a FcγRI puede bloquearse de manera eficiente usando el anticuerpo bloqueador anti-FcRI (M21, Ancell). Las condiciones de ensayo difieren ligeramente del ensayo basado en PBMC. 20:1 objetivo a efectora; Incubación 18-14 horas a 37C.

Los mutantes Fc se probaron que muestran ADCC PBMC mejorada, unión mejorada a FcγRIIIA, o unión disminuida a FcγRIIB . 32).

6.12 Efecto de mutantes Fc en la actividad del complemento

Los mutantes Fc originalmente se identificaron basado en su unión aumentada a FcγRIIIA. Estos mutantes se validaron posteriormente por su afinidad mejorada para todos los receptores de baja afinidad y en muchos casos actividad en ADCC mediada por PBMC mejoradas. La citotoxicidad mediada por anticuerpo in vivo puede ocurrir a través de múltiples mecanismos. Adicionalmente a ADCC otros posibles mecanismos incluyen la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y apoptosis. La unión de C1q a la región Fc de una inmunoglobulina se inicia como la cascada resultante en la lisis celular por CDC. La interacción entre C1q y Fc se ha estudiado en una serie de mutantes Fc. Los resultados de estos experimentos indican que C1q y FcR de afinidad baja se unen a regiones de superposición de la Fc, sin embargo, la residuos de contacto exactos dentro de Fc varían.

Los mutantes que mostraron ADCC mejorada en el ensayo basado en PBMC se examinaron por su efecto en CDC. Se analizaron los anticuerpos en el anti CD20 Ch-mAb, 2H7. Detectamos CDC mejorada para cada mutante ch-mAb probado. Curiosamente aunque estos mutantes se seleccionaron por su ADCC mejorada muestran además una CDC mejorada.

MATERIALES Y MÉTODOS. El ensayo de CDC se usó para probar los mutantes Fc usando anti-CD20 y células Daudi como objetivos. El suero de conejillo de indias se usó como fuente para el complemento (US Biological). El ensayo CDC fue similar a ADCC basado en PBMC. Las células objetivo se cargaron con europio y opsonizaron con ChMAb. Sin embargo el complemento, suero conejillo de indias, se añadió en lugar de células efectoras. La Fig. 33 muestra un diagrama de flujo del ensayo. ChMab anti-CD20 se tituló más de 3 órdenes de magnitud. Se calculó el % de lisis Las células Daudi, (3 x 10⁶) se marcaron con reactivo BADTA. 1 x 10⁴ células se alicuotaron en los pocillos en una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se titularon en los pocillos usando diluciones de 3 veces. La reacción de opsonización se dejó continuar durante 30-40 minutos a 37 °C en 5 % de CO₂. El suero de conejillo de Indias se añadió a una concentración final de 20 %. La reacción se dejó continuar durante 3.5 hrs a 37 °C en 5 % de CO₂. Posteriormente, se añadió 100 uls de medio celular a la reacción y las células se centrifugaron. Para la detección 20 uls del sobrenadante se añadió a 200 uls de la solución de europio y las placas se leyeron en el Victor2(Wallac).

RESULTADOS: Todos los mutantes que muestran unión mejorada, ya sea para activar FcR o C1q se colocaron en el ensayo CDC (Fig. 34). Los mutantes Fc que mostraron una unión mejorada a FcγRIIIA mostraron además actividad de complemento mejorada. Cada uno de los mutantes muestran actividad del complemento mejorada en comparación con el silvestre. Los mutantes probados son mutantes dobles. En cada caso, una de las mutaciones presentes es P396L.

Para determinar si el aumento en la CDC correlacionó con la unión mejorada de C1q a Fc de IgG1 la unión entre las dos proteínas se midió en tiempo real usando resonancia de plasmón de superficie. Para examinar la unión entre C1q y un Fc de IgG1 las Fc variantes se clonaron en un anti-CD32B ch-mAB, 2B6. Esto permitió capturar los anticuerpos wt y mutantes en el portaobjetos de vidrio a través de la proteína soluble CD32B (Fig. 36A). Tres de los cuatro mutantes probados en CDC se examinaron además en el Biacore. Los 3 mostraron Koff muy mejorada en comparación con el Fc silvestre (Fig. 36B). El formato Biacore para la unión C1q a mutantes 2B6 demuestra unión mejorada de mutantes con mutación P396L (Fig. 37). La mutación D270E puede reducir la unión C1q en diferente grado. Un resumen del análisis cinético de FcγR y unión a C1q se representa en la tabla 25.

TABLA 25 ANÁLISIS CINÉTICO DE unión de FcγR y C1q al mutante 2B6

2B6mutantes	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcag1	2aH131Fcag1	C1q
Tipo silvestre	0.192	0.434	0.056	0.070	0.053	0.124
MgFc38 (K392T,P396L)	0.114	0.243	0.024	0.028	0.024	0.096
MgFc51 (Q419H,P396L)	0.142	0.310	0.030	0.036	0.028	0.074
MgFc55 (R255I,P396L)	0.146	0.330	0.030	0.034	0.028	0.080
MgFc59 (K370E,P396L)	0.149	0.338	0.028	0.033	0.028	0.078
MgFc31/80	0.084	0.238	0.094	0.127	0.034	0.210
MgFc51/80	0.112	0.293	0.077	0.089	0.028	0.079
MgFc55/80	0.113	0.288	0.078	0.099	0.025	0.108
MgFc59/80	0.105	0.296	0.078	0.095	0.024	0.107

6.13 Diseño de Fc variantes con unión disminuída a FcγRIIB

Basado en una selección de mutantes Fc que reducen la unión a FcγRIIB y aumentan la unión a FcγRIIA131H se identificaron un número de mutaciones que incluyen D270E. Cada mutación se probó individualmente para la unión a los receptores Fc de baja afinidad y sus variantes alélicas.

D270E tuvo las características de unión que sugirieron que específicamente reduce la unión a FcγRIIB. D270E se probó en conjunto con mutaciones que previamente se identificaron basado en su unión mejorada a todos los FcR.

RESULTADOS. Como se muestra en las Tablas 26 y 27 y las Figs. 38 y 39, la adición de la mutación D270E mejora la unión a FcγRIIIA y FcγRIIA H131 y reduce la unión a FcγRIIB. La Fig. 40 muestra la representación de los datos de MDM ADCC contra la Koff determinado para la unión CD32A H131H para seleccionar mutantes.

TABLA 26 TASA (1/S) DE LA UNIÓN DE FcγR AL Ab 4D5 QUIMÉRICO MUTANTE Y SILVESTRE OBTENIDO POR EL ANÁLISIS BIA CORE

4D5Mutantes	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
Wt puro	0.175	0.408	0.078	0.067	0.046
MgFc55	0.148	0.381	0.036	0.033	0.029
MgFc55/60	0.120	0.320	0.092	0.087	0.013
MgFc55/60+R292G	0.118	0.405	0.124	0.112	0.037
MgFc55/60+Y300L	0.106	0.304	0.092	0.087	0.015
MgFc52	0.140	0.359	0.038	0.040	0.026
MgFc52/60	0.122	0.315	0.094	0.087	0.013
MgFc59	0.145	0.378	0.039	0.047	0.033
MgFc59/60	0.117	0.273	0.088	0.082	0.012
MgFc31	0.125	0.305	0.040	0.043	0.030
MgFc31/60	0.085	0.215	0.139	0.132	0.020
MgFc51	0.135	0.442	0.060	0.047	0.062
MgFc51/60	0.098	0.264	0.118	0.106	0.023
MgFc38	0.108	0.292	0.034	0.025	0.032
MgFc38/60	0.089	0.232	0.101	0.093	0.021

TABLA 27 CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE 4D5 MUTANTES

4D5Mutantes	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
MgFc70	0.101	0.250	0.030	0.025	0.025
MgFc71	0.074	0.212	0.102	0.094	0.020
MgFc73	0.132	0.306	0.190	-----	0.024
MgFc74	0.063	0.370	n.b.	0.311	0.166
WT023stable	0.150	0.419	0.071	0.068	0.043

6.14 Análisis de los parámetros cinéticos de los mutantes Fc

Los parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos quiméricos 4D5 que albergan mutantes de Fc a los dos alotipos de FcγRIIIA, FcγRIIA131H y FcγRIIB se analizaron por BIAcore usando un método similar al que se describió en la Sección 6.8 arriba. Los dos alotipos de FcγRIIIA, FcγRIIIA 158V y FcγRIIIA 158F, se describieron en detalles adicionales en la Sección 6.9 arriba.

Materiales y Métodos

Ambos alotipos de FcγRIIIA usados en este ensayo fueron proteínas monoméricas solubles, la región extracelular de FcγRIIIA se unió a la secuencia enlazador-AVITAG como se describió en la Sección 6.2. Los FcγRIIB y FcγRIIA usados en este ensayo fueron proteínas dimericas solubles, es decir los dominios extracelulares de FcγRIIB o FcγRIIA fusionados al dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG2 humana como se describió en la Sección 6.8 arriba.

Los detalles de la metodología y análisis BIAcore se encuentran en la Sección 6.8. En este ensayo, las regiones Fc variantes se clonaron en un anticuerpo quimérico 4D5, que es específico para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu). El antígeno, HER2/neu, se inmovilizó sobre una de las celdas de flujo del chip

sensor. Los anticuerpos quiméricos 4D5 que portan las mutaciones Fc se pasaron después sobre la superficie por inyecciones de 3 minutos de una solución 300 nM a tasa de flujo de 5 µl/min. Luego, series de dilución del receptor en tampón HBS-P (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 0.005 % de tensoactivo P20, 3 mM de EDTA, pH 7.4) se inyectaron en la superficie a 100 µl/min.

- 5 Las curvas de unión de dos concentraciones diferentes de receptor (400 nM y 800 nM, tanto para FcγRIIIA V158 como FcγRIIIA 158F; 100 nM y 200 nM tanto para FcγRIIA como FcγRIIB) se alinearon y las respuestas ajustaron a los mismos niveles de anticuerpos capturados, y las curvas de referencia se restaron a partir de las curvas experimentales. Las fases de asociación y disociación se ajustaron separadamente.

Resultados

- 10 La unión de FcγRIIIA, alotipo 158 V y 158F, FcγRIIB y FcγRIIA 131H se analizaron y las respuestas de resonancia se normalizaron al nivel de respuesta obtenida para un anticuerpo quimérico silvestre 4D5. Los parámetros cinéticos para la unión de los FcγRs al anticuerpo quimérico 4D5 se obtuvieron ajustando los datos a dos concentraciones diferentes de FcγR: 400 nM y 800 nM tanto para FcγRIIIA V158 como FcγRIIIA 158F; 100 nM y 200 nM tanto para FcγRIIA como FcγRIIB.
- 15 La Tabla 28 presenta la tasa para cada uno de los cuatro receptores analizados en asociación con las regiones Fc variantes indicadas.

Tabla 28 Tasa (1/s) de la unión de FcγR al Ab 4D5 quimérico mutante y silvestre obtenido por análisis BIAcore

Región Fc 4D5 quimérica	aminoácido en la posición					Receptor FcγR			
	243	292	300	305	396	3A 158V	3A 158F	2B	2A 131H
Silvestre	F	R	Y	V	P	0.186	0.294	0.096	0.073
MgFc0088	L	P	L	I	L	0.016	0.064	0.058	0.035
MGFc0143	I	P	L	I	L	0.017	0.094	0.091	0.049
Cuadruple									
MGFc0088A	L	P	L		L	0.016	0.094	0.075	0.044
MGFc0084	L	P		I	L	0.048	0.133	0.278	0.083
MGFc0142	L		L	I	L				
Triple									
MGFc0155	L	P	L			0.029	0.135	0.155	0.057
MGFc0074	L	P		I		0.083	0.37	NE	0.166
MGFc0093		P		I	L	0.080	0.197	0.125	0.190
Doble									
MGFc0162	L	P				0.041	0.515	0.900	0.18
MGFc0091	L				L	0.108	0.330	0.036	0.026
MGFc0070		P		I		0.101	0.250	0.030	0.025
Sencilla									
SV12/F243L	L					0.048	0.255	0.112	0.100
MGFc0161		P				0.067	0.485	0.421	0.117
		G				0.124	NT	0.384	NT
MGFc0092			L			0.211	NT	0.058	0.02
MGFc0089					L	0.127	0.306	0.031	0.036

- 20 La Tabla 29 presenta los resultados de un estudio duplicado en donde los valores K_{off} de los anticuerpos quiméricos 4D5 se calcularon en relación con las tasas del silvestre. Números relativos mayores que uno indican una disminución de la tasa K_{off} . Números menores de un indican un aumento en la tasa K_{off} .

Tabla 29 Tasa relativa de los anticuerpos ch4D5 obtenidos por análisis BIAcore

Región Fc 4D5 quimérica	Tasa relativa del Receptor FcγR ($K_{off}^{WT}/K_{off}^{MUT}$)			
	3A 158V	3A 158 F	2B	2A 131H
F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L	10.06	8.25	1.38	1.11
F243L, R292P, Y300L	6.69	2.3	0.32	0.65
F243L, R292P, P396L	5.37	3.52	0.32	0.65
F243L, R292P, Y300L, P396L	10.06	5.62	1.07	0.89
F243L, R292P, V305I	2.56	1.43	nb*	0.23
F243L	4.79	3.44	0.84	0.57

*nb, sin unión

6.15 Ensayo de ADCC de mutantes Fc

Las mutaciones Fc identificadas en el Ejemplo 6.14 que comprenden afinidad aumentada por FcγIIIa y/o FcγIIa se analizaron por su actividad ADCC relativa.

5 Materiales y Métodos

Los detalles referentes a los ensayos de ADCC se encuentran en la Sección 6.7. En este ensayo, las células de carcinoma de colon HT29 (ATCC núm. de Acceso HTB-38) cargadas con Indio-111 se usaron como objetivos y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron de donantes usando un gradiente de Ficoll. Las células objetivo se opsonizaron con anticuerpos quiméricos 4D5 que comprenden las regiones Fc variantes a concentraciones finales de 2-5000 ng/ml. Las células objetivo opsonizadas se añadieron después a células efectoras para producir una relación efectora:objetivo de 50:1 y se incubaron durante 18 horas a 37°C, 5 % de CO₂. Después de la incubación, las células se centrifugaron a ~220xg durante cinco minutos a 10°C. El nivel de Indio-111 en el sobrenadante se registró por un contador gamma.

Resultados

Los anticuerpos quiméricos 4D5 que comprenden regiones Fc variantes MGFc88 (F243L,R292P,Y300L,V305I,P396L), MGFc88A (F243L,R292P,Y300L, P396L) y MGFc155 (F243L,R292P,Y300L) se seleccionaron basado en la afinidad mejorada por FcγRIIIa y/o FcγIIa y probaron para su actividad ADCC. Las Figs. 41A & B muestran que las Fc variantes probadas exhiben actividad ADCC mejorada en relación con el anticuerpo silvestre a concentraciones de opsonización por encima de 20 ng/ml en una forma dependiente de la concentración. Los datos indican que los mutantes Fc identificados que comprenden afinidad aumentada por FcγRIIIa tienen buenas probabilidades además de exhibir actividad ADCC mejorada.

6.16 Control del crecimiento tumoral mediado por Fc mutante en un modelo tumoral in vivo

Las mutaciones Fc identificadas que comprenden afinidad mejorada por FcγIIIa y/o FcγIIa se analizaron además por la eficacia relativa de control del tumor usando un sistema de modelo tumoral in vivo.

25 Materiales y Métodos

Los anticuerpos que albergan los mutantes Fc se probaron para la actividad antitumoral en un sistema de xenoinjerto murino. Ratones Balb/C desnudos se inyectan por vía subcutánea con 5x10⁶ células Daudi y seguidamente se controlaron para los signos generales de la enfermedad, por ejemplo, aumento/pérdida de peso y actividad de acicalamiento. Sin tratamiento, este sistema modelo resulta en 100 % de mortalidad con un promedio de tiempo de supervivencia de aproximadamente 2 semanas posterior a la inoculación de la célula tumoral. El tratamiento consiste en la dosis de anticuerpo silvestre o anticuerpo que comprende una región Fc variante administrada a intervalos semanales. Los animales administrados solo con tampón en los mismos intervalos sirven como control. Se calcula el peso del tumor basado en el volumen estimado del tumor subcutáneo de acuerdo con la fórmula (ancho 2 X longitud)/2.

35 Resultados

5 A intervalos semanales, los ratones inoculados con células Daudi recibieron 2B6 humanizado silvestre ("h2B6"), 2B6 humanizado que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) ("h2B6 0088") o tampón solo. El anticuerpo h2B6 silvestre y mutante de Fc mostró niveles similares de supresión tumoral en el esquema de dosis más alta probada, dosis semanales de 25 µg (Figuras 42A y B). Sin embargo, diferencias significativas en la eficacia del anticuerpo se observaron cuando las dosis se redujeron. La reducción de 100 y 10 veces en las dosificaciones de h2B6 silvestre no proporcionó ningún control del tumor mayor que la administración del tampón solo (Fig. 42 A). En contraste, h2B6 0088 proporcionó una protección significativa a dosis de 2.5 µg semanales y al menos protección limitada a dosis semanales de .25 µg (Fig. 42 B).

10 La protección conferida por incluso la dosis más baja de anticuerpo mutante de Fc se confirmó en las comparaciones de supervivencia. A las 11 semanas, 4 de cada 7 ratones permanecieron vivos en el grupo tratado con dosis de 0.25 µg de h2B6 0088 en comparación con solamente 1 de 7 en el grupo tratado con la misma dosis de h2B6 silvestre (Figs. 43A & B)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Macrogenics, Inc.

15 <120> Identificación y manipulación genética de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de uso de estos

<130> 11183-055-228

<140> 60/707,419

< 141> 2005-08-10

<160> 30

20 <170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

< 211> 121

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

25 <220>

< 223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 1

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

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H2B6VH-A

<400> 2

10

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

<110> Macrogenics, Inc.

<120> Identificación y manipulación genética de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de uso de estos

<130> 11183-055-228

15 <140> 60/707,419

< 141> 2005-08-10

<160> 30

ES 2 579 602 T3

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

< 211> 121

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena pesada humanizada

<400> 1

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

10 <210> 2

< 211> 121

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> H2B6VH-A

<400> 2

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H2B6VH-3

<400> 3

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

10 <210> 4

<211> 107

<212> PRT

ES 2 579 602 T3

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera humanizada 2B6 - Hu2B6VL-1

<400> 4

```

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

5

<210> 5

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10 <220>

< 223> Región variable de cadena ligera humanizada 2B6- Hu2B6VL-2

<400> 5

```

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

ES 2 579 602 T3

<210> 6

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5 <220>

< 223>Región variable de cadena ligera humanizada 2B6 - Hu2B6VL-3

<400> 6

```

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

<210> 7

10 < 211> 107

< 212> PRT

< 213> mus sp.

<220>

< 223>Región variable de cadena ligera de ratón 3H7

15 <400> 7

```

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

```

<210> 8

< 211> 107

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> H2B6VL-5

<400> 8

```

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

```

10 <210> 9

< 211> 116

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> 8B5.3.4 VH

<400> 9

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser 10 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro 25 Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 80 Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 Thr Val Ser Ser 110
 115

<210> 10

< 211> 107

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> 8B5.3.4 VL

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
 1 Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser 10 Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
 35 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

10

<210> 11

< 211> 321

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

15 <220>

ES 2 579 602 T3

< 223> 8B5.3.4 VL

<400> 11

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgagg cgctgggaga aagagtcagt 60
ctcacttgct gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120
gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240
gaagattttg cagactatta ctgtctacaa ttttttagtt atccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321
```

<210> 12

5 < 211> 348

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> 8B5.3.4 VH

10 <400> 12

```
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 180
tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240
gtctacctgc aatgaacag ctaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 300
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcg 348
```

<210> 13

< 211> 121

< 212> PRT

15 < 213> mus sp.

<220>

< 223> Región variable de cadena pesada de ratón 2B6

<400> 13

ES 2 579 602 T3

```

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

```

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

5 <213> mus sp.

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de ratón 2B6

<400> 14

```

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

```

10 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Región variable de cadena pesada 2B6 - CDR1

<400> 15

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 16

< 211> 5

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena pesada 3H7- CDR1

<400> 16

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

10

<210> 17

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15 <220>

< 223> Región variable de cadena pesada 2B6 - CDR2

<400> 17

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 18

20 < 211> 19

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena pesada 3H7 - CDR2

25 <400> 18

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 19

< 211> 12

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena pesada 2B6 - CDR3

<400> 19

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 20

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Región variable de cadena pesada 3H7- CDR3

<400> 20

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 21

< 211> 11

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera 2B6 - CDR1

<400> 21

Arg Thr ser Gln ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 22

< 211> 11

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera 3H7- CDR1

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

10 <210> 23

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Región variable de cadena ligera 2B6 - CDR2

<400> 23

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 24

< 211> 7

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera 2B6 - CDR2

<400> 24

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

25

<210> 25

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

5 < 223> Región variable de cadena ligera 2B6 - CDR2

<400> 25

Tyr Ala ser Glu ser Ile Ser
1 5

<210> 26

< 211> 7

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera 3H7 - CDR2

<400> 26

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

15

<210> 27

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

20 <220>

< 223> Región variable de cadena ligera 2B6 - CDR3

<400> 27

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 28

25 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Región variable de cadena ligera 3H7 - CDR3

<400> 28

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 29

< 211> 451

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> H2B6Hc-3Fc0088 (cadena pesada)

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr 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 Arg 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 Leu 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 Pro Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Leu
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Ile 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 Leu
 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> 30

< 211> 214

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5 <220>

< 223> H2B6 Lc-5 (cadena ligera)

<400> 30

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una región Fc de IgG1 variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una región Fc de IgG1 de tipo silvestre, de manera que:

(I) dicha región Fc variante de dicho polipéptido se une a:

5 (A) FcγRIIIA con una mayor afinidad, y

(B) FcγRIIB con una afinidad de unión alterada;

en donde dichas afinidades de unión mayores y alteradas son en relación con las afinidades de unión exhibidas por dicho polipéptido a dichas FcγRs si comprende una región Fc de tipo silvestre; y

10 (II) en donde dicha al menos una modificación de aminoácidos comprende un conjunto de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:

(1) una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 292 con prolina;

(2) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina:

(3) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina;

(4) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; y

15 (5) una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina;

en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el índice de EU como en Kabat.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo, que contiene dicha región Fc variante.

20 3. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.

4. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable que se une a CD16A o CD32B.

25 5. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo es el anticuerpo 2B6 producido por el hibridoma que tiene el No. de acceso de ATCC PTA-4591.

6. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo es una versión humanizada del anticuerpo 2B6 producido por el hibridoma que tiene el No. de acceso de ATCC PTA-4591.

7. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo 2B6 producido por el hibridoma que tiene el No. de acceso de ATCC PTA-4591 a CD32B.

30 8. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.

9. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.

35 11. Un método para producir recombinantemente el polipéptido de la reivindicación 1, dicho método que comprende: (i) cultivar en un medio una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido; y (ii) recuperar dicho polipéptido de dicho medio.

12. El anticuerpo o fragmento de este de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo o dicho fragmento además se une específicamente a un antígeno de cáncer o un antígeno de un agente infeccioso.
13. El anticuerpo, o fragmento de este de la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo media la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos mejorada en relación con un anticuerpo comparable que comprende una región Fc tipo silvestre.
14. El uso del anticuerpo, o fragmento de este de la reivindicación 12 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por dicho antígeno de cáncer.
15. El anticuerpo, o fragmento de este, de la reivindicación 12, o el uso de la reivindicación 14, en donde dicho antígeno de cáncer es MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, beta-catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6, virus del papiloma humano-E7, o MUC-1.
16. El anticuerpo, o fragmento de este, de la reivindicación 12, o el uso de la reivindicación 14, en donde dicho antígeno de cáncer es un antígeno de carcinoma de mama, ovario, próstata, cervical, o pancreático.
17. El uso del polipéptido de la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
18. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 1, o del anticuerpo o fragmento de este de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, 12-13 o 15-16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
19. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de la reivindicación 2.
20. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
21. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
22. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo tiene una actividad ADCC mejorada en relación con la actividad ADCC de dicho anticuerpo si comprendiera una región Fc tipo silvestre.
23. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicha región Fc variante comprende además una o más de las modificaciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 5, 6, 7, u 8.

Secuencia de nucleótidos / aminoácidos de 8B5.3.4 VL

```

gac att cag atg aca cag tct cca tcc tcc cta ctt gcg gcg ctg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
 1           5           10           15

gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gaa att agt ggt tac 96
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
           20           25           30
                CDR1

tta agc tgg ctt cag cag aaa cca gat gga act att aaa cgc ctg atc 144
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
           35           40           45

tac gcc gca tcc act tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
                CDR2

agt gag tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agt ctt gag tct 240
Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
           65           70           75           80

gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat ttt agt tat ccg ctc 288
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
           85           90           95
                CDR3

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
           100           105
    
```

Figura 1

Secuencia de nucleótidos / aminoácidos de 8B5.3.4 VH

gaa gtg aag ctt gag gag tct gga gga ggc ttg gtg caa cct gga gga	48
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc atg aaa ctc tct tgt gaa gcc tct gga ttc act ttt agt gac gcc	96
Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala	
20 25 30	
CDR1	
tgg atg gac tgg gtc cgt cag tct cca gag aag ggg ctt gag tgg gtt	144
Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
CDR2	
gct gaa att aga aac aaa gct aaa aat cat qca aca tac tat gct gag	192
Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu	
50 55 60	
tct gtg ata ggg agg ttc acc atc tca aga gat gat tcc aaa agt agt	240
Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser	
65 70 75 80	
gtc tac ctg caa atg aac agc tta aga gct gaa gac act ggc att tat	288
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr	
85 90 95	
CDR3	
tac tgt ggg gct ctg ggc ctt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc	336
Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu	
100 105 110	
aca gtc tcc tcg	348
Thr Val Ser Ser	
115	

Figura 2



Figura 3

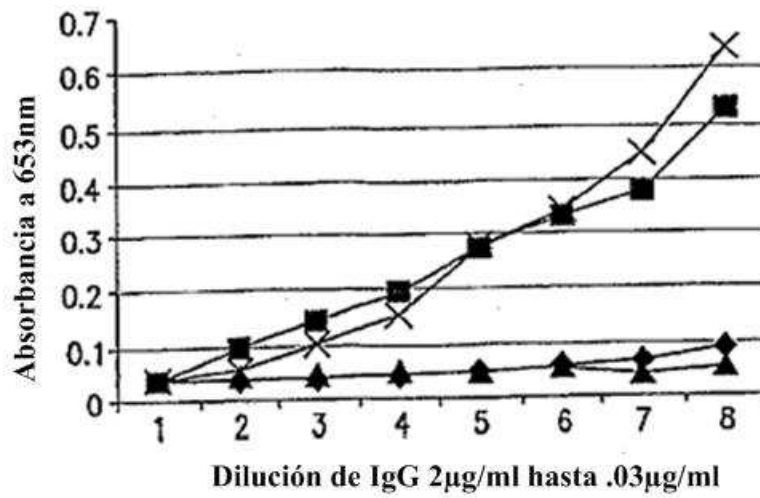


Figura 4

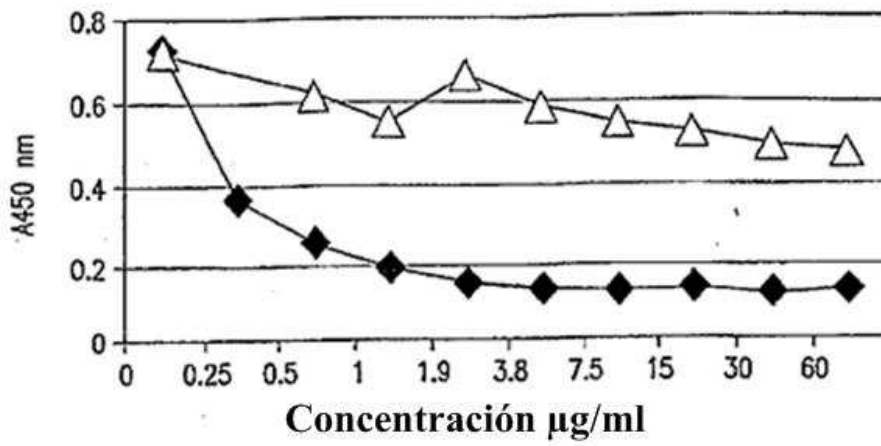


Figura 5A

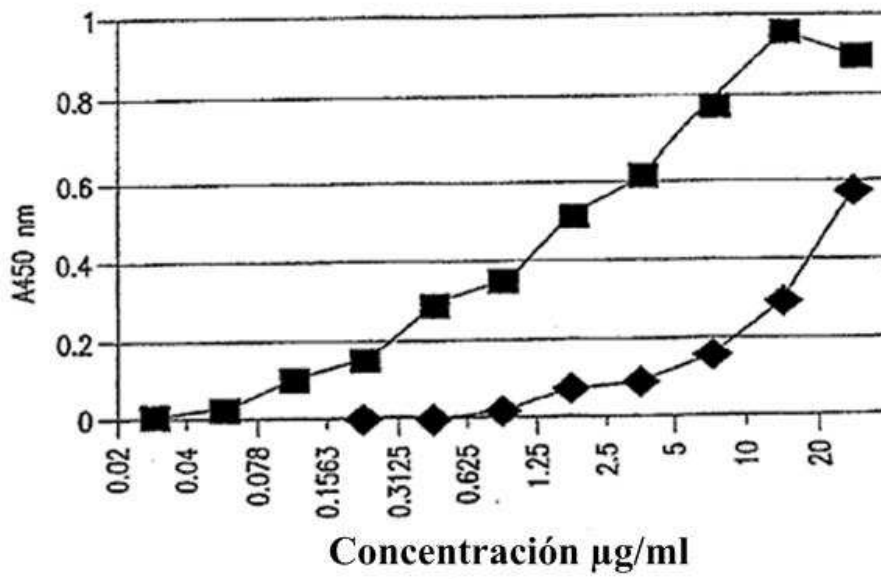


Figura 5B

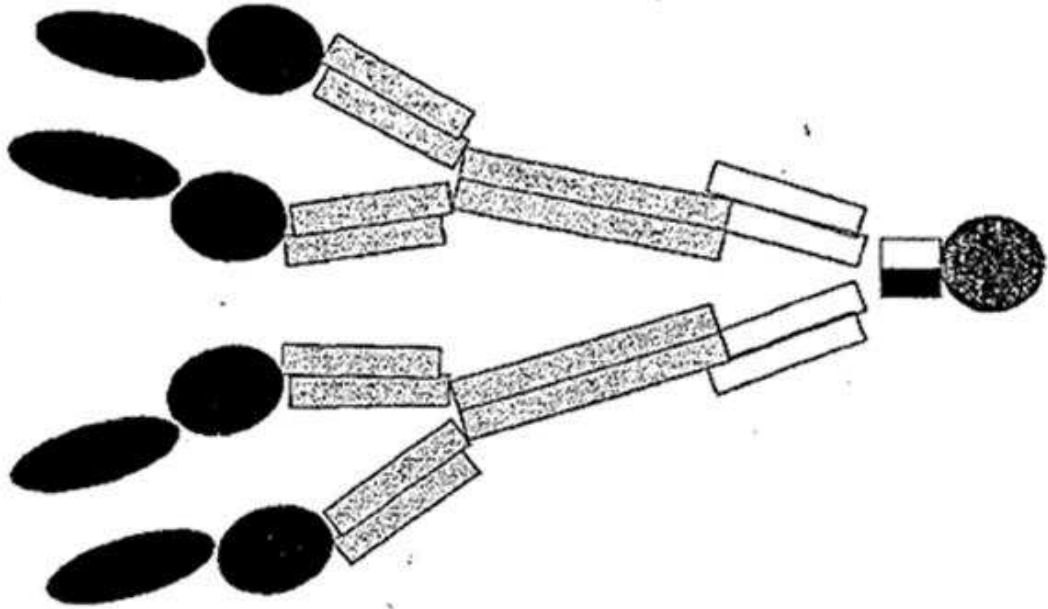


Figura 6A

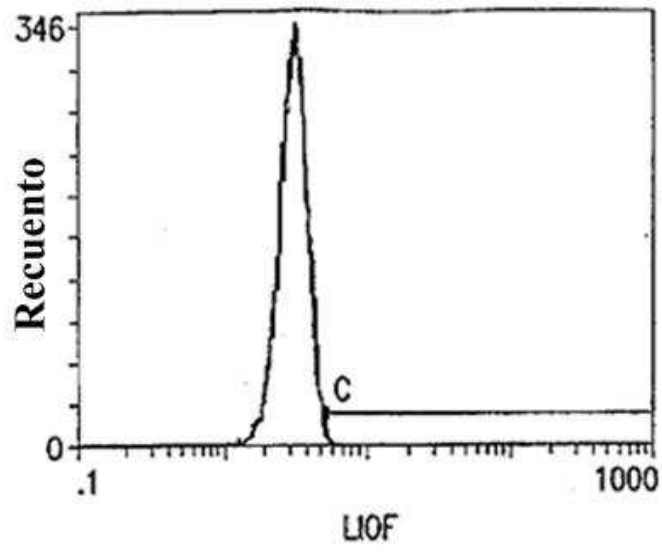


Figura 6B-A

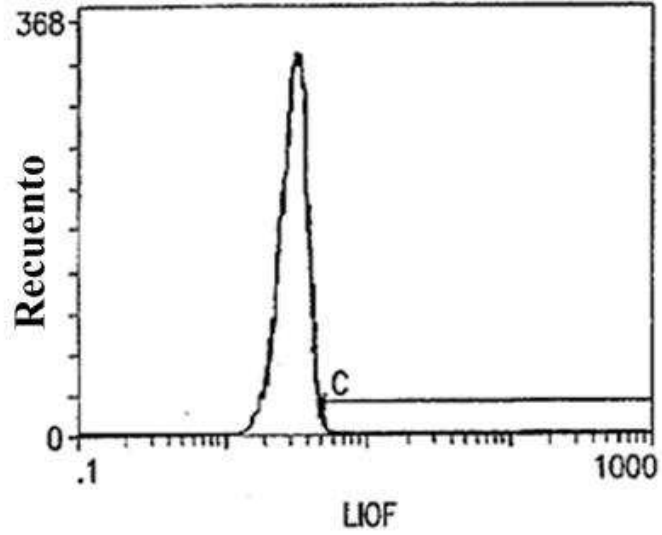


Figura 6B-B

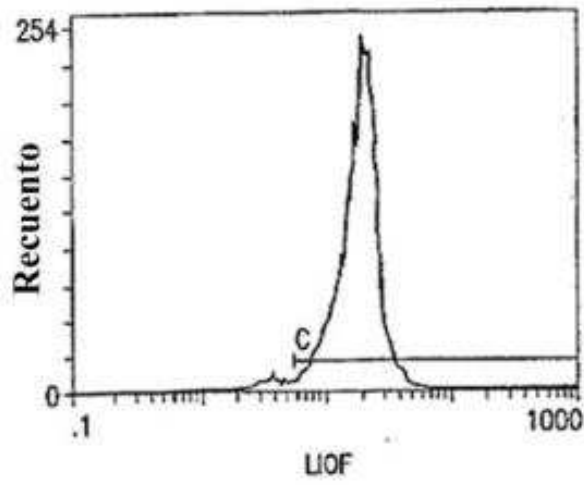


Figura 6B-C

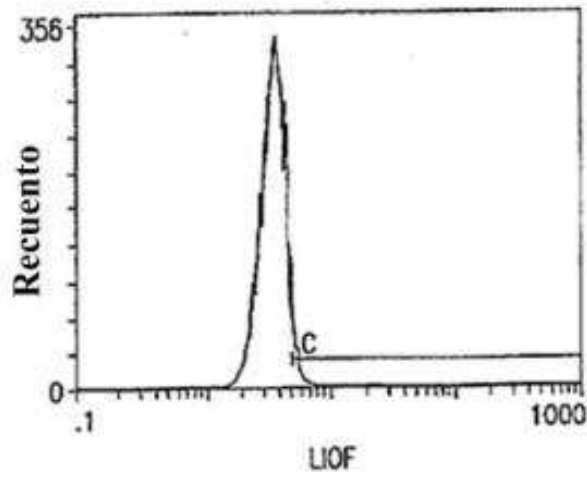


Figura 6B-D

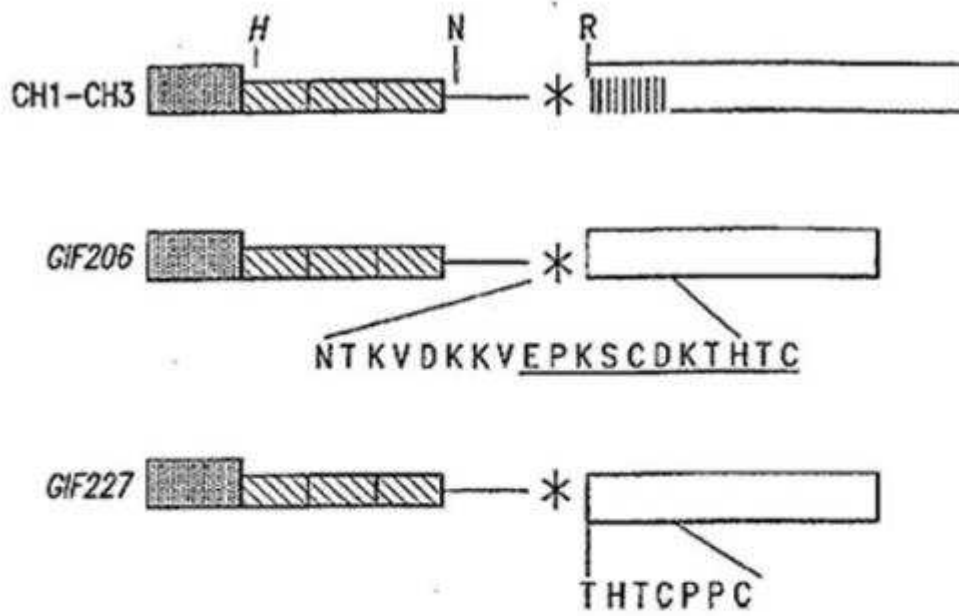


Figura 7

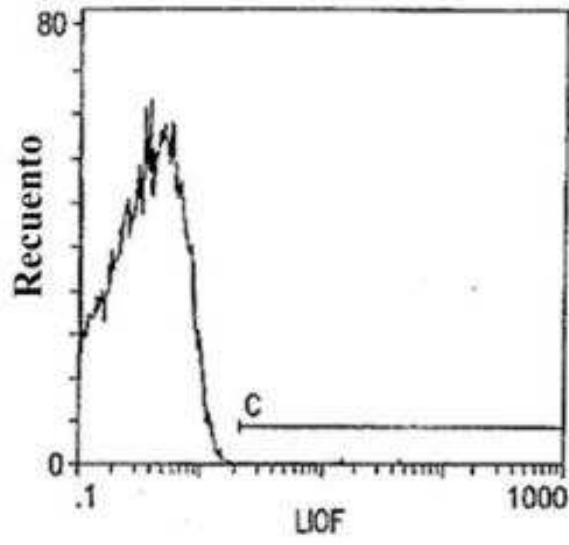


Figura 8-A

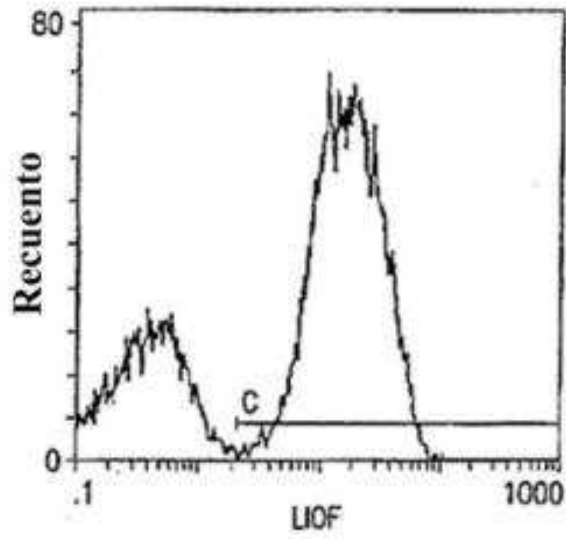


Figura 8-B

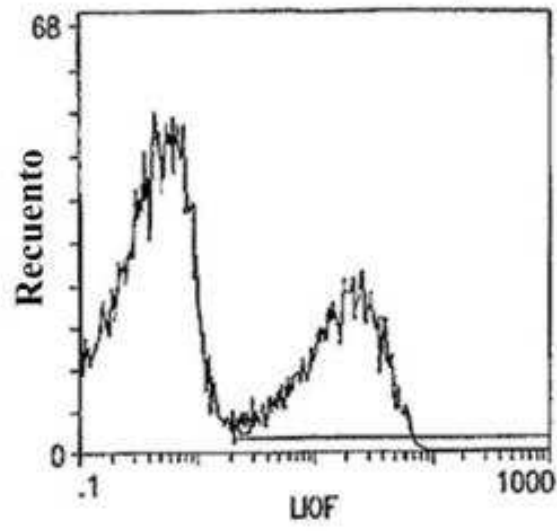


Figura 8-C

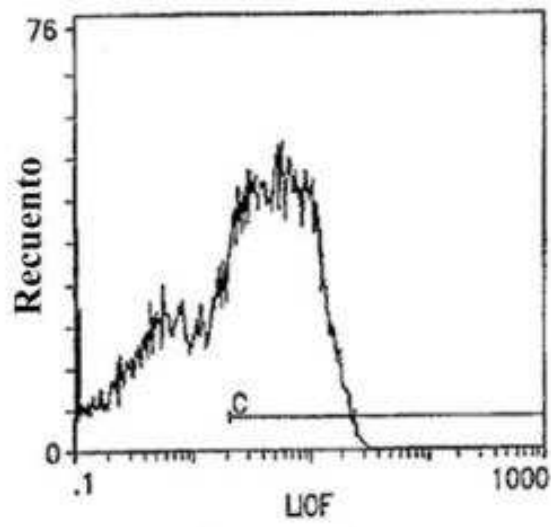


Figura 8-D

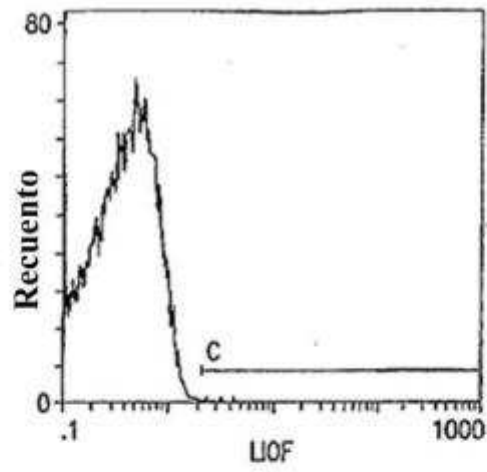


Figura 8E

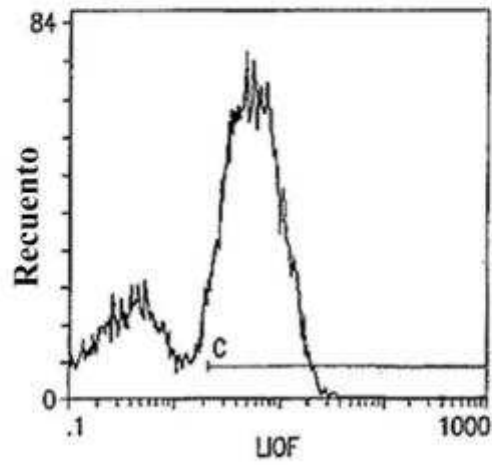


Figura 8F

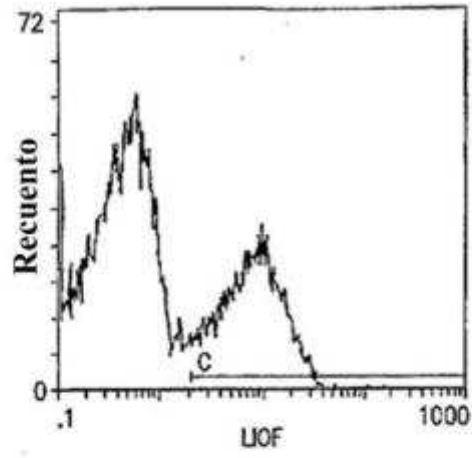


Figura 8G

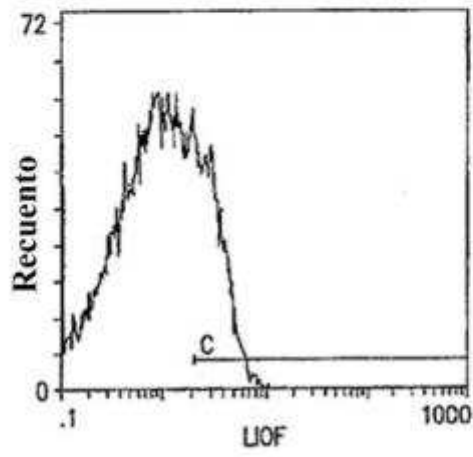


Figura 8H

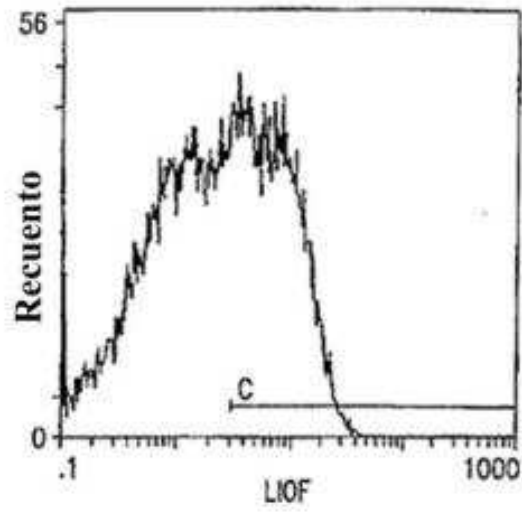


Figura 9A

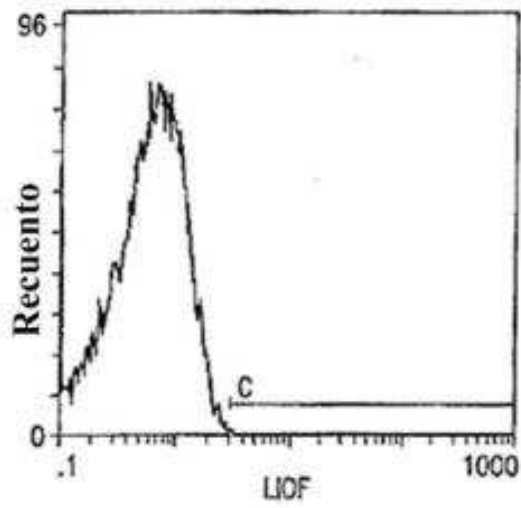


Figura 9B

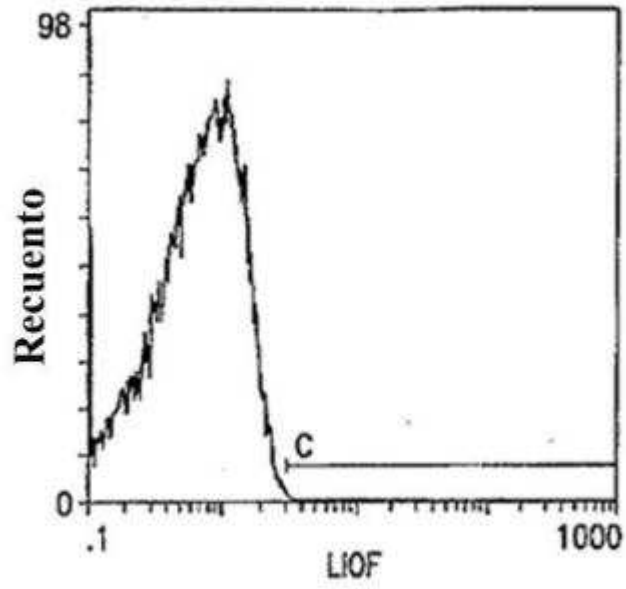


Figura 9C

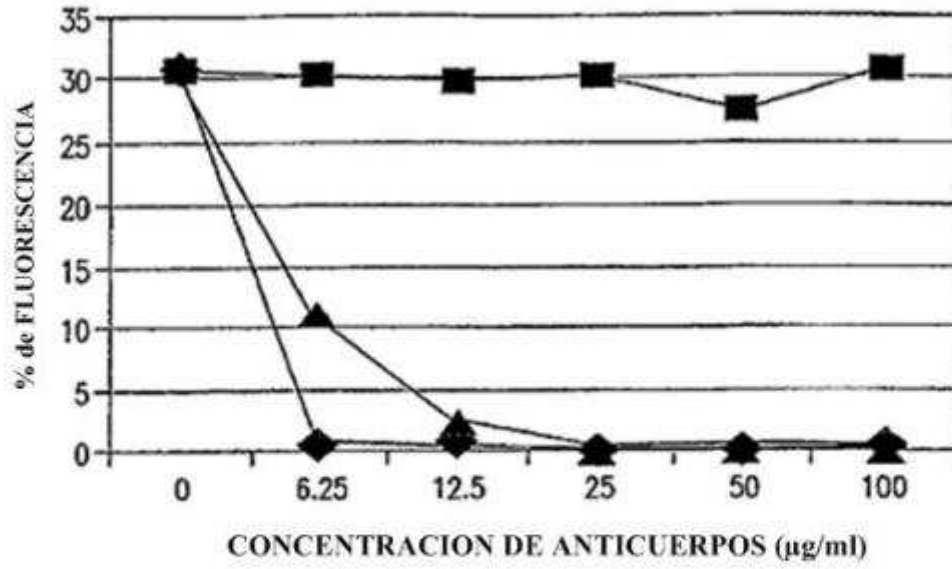


Figura 10

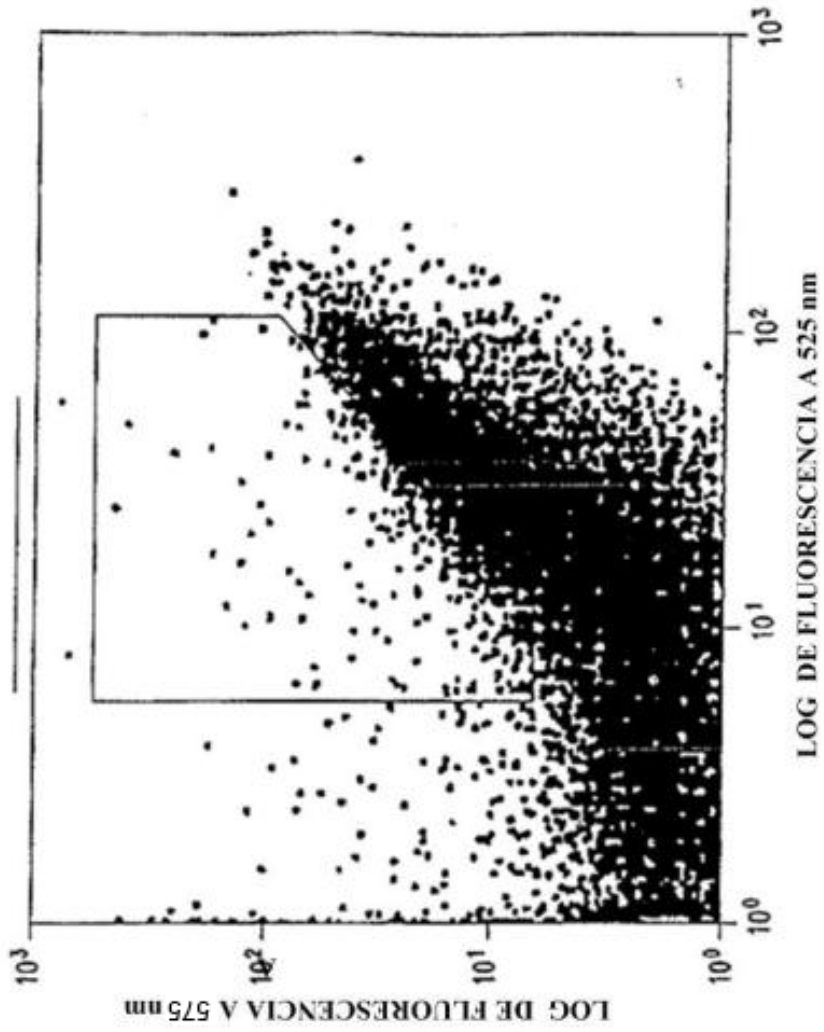


Figura 11

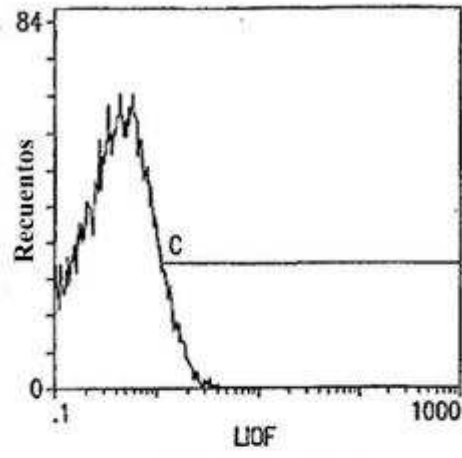


Figura 12A

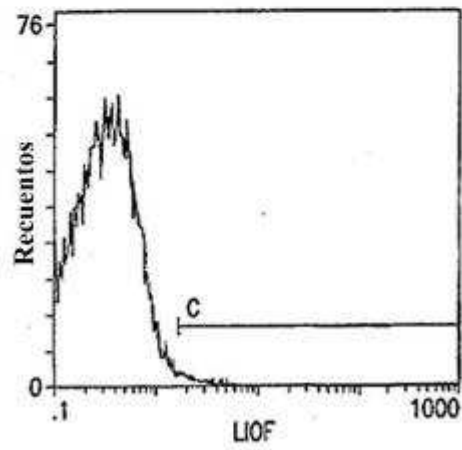


Figura 12B

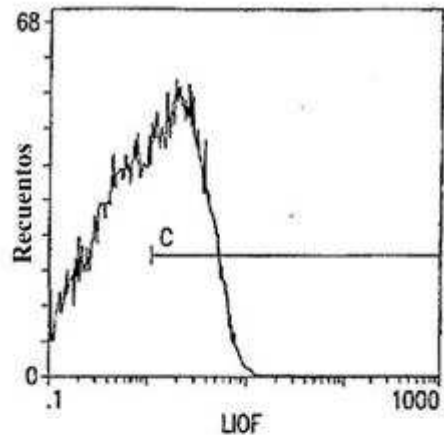


Figura 12C

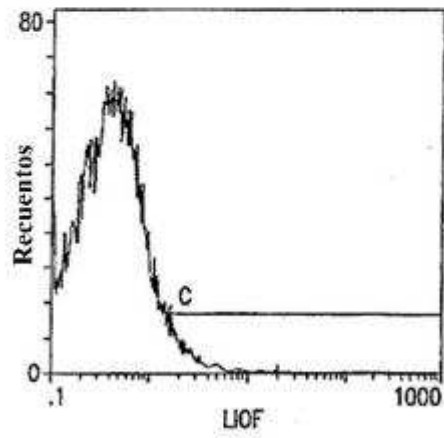


Figura 12D

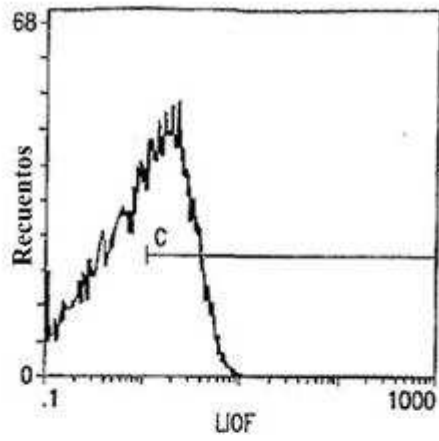


Figura 12E

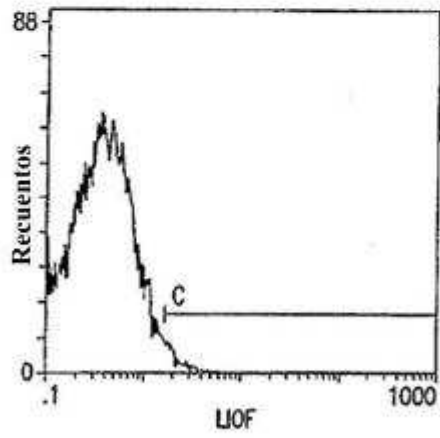


Figura 12F

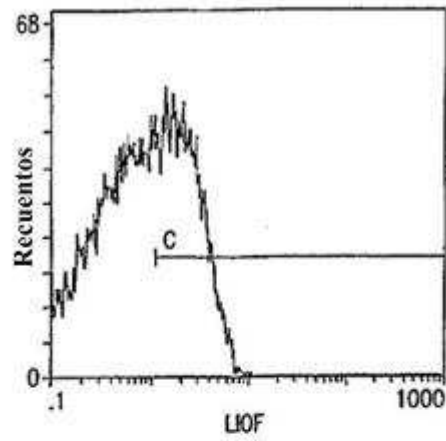


Figura 12G

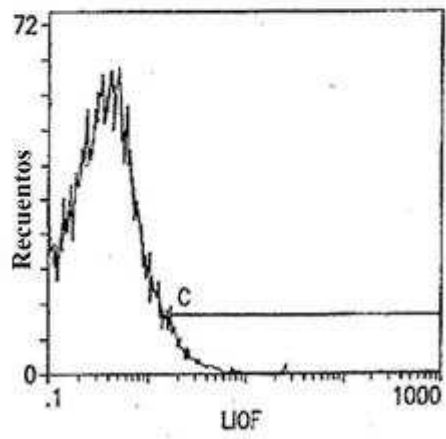


Figura 12H

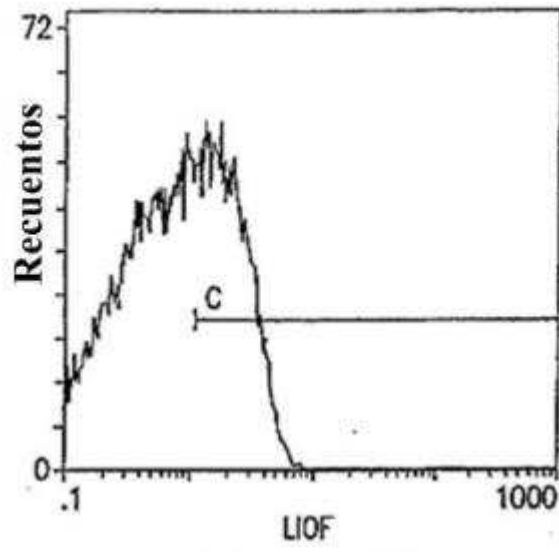


Figura 12I

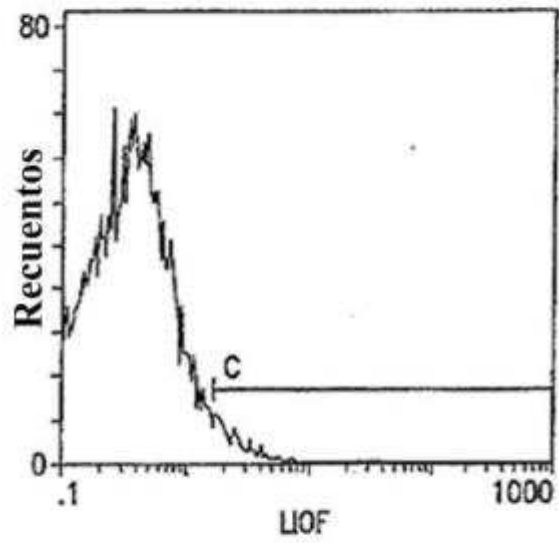


Figura 12J

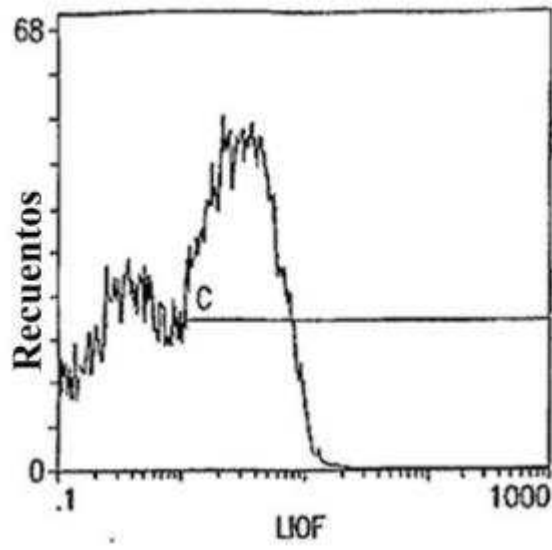


Figura 12K

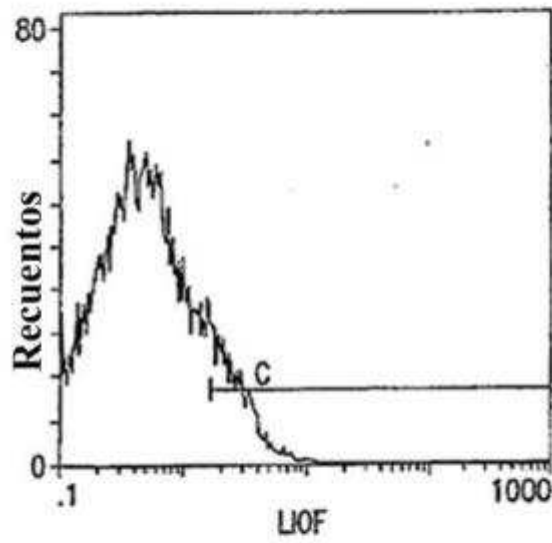


Figura 12L

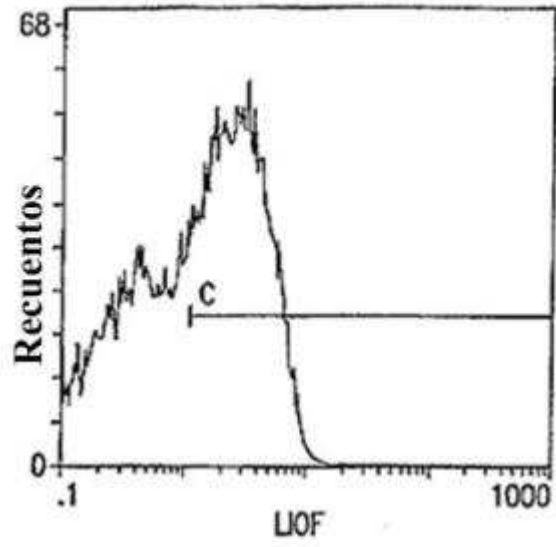


Figura 12M

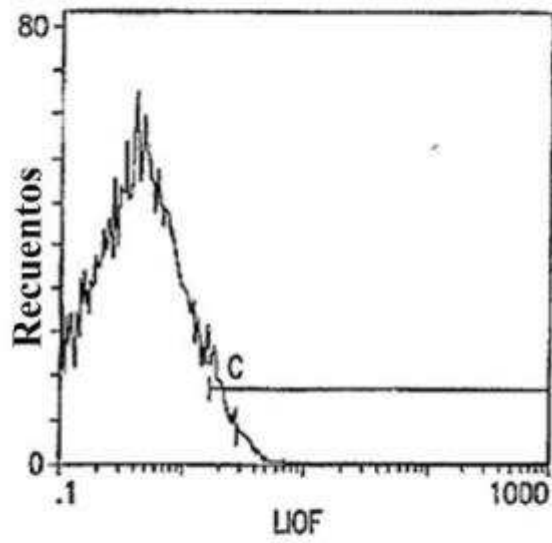


Figura 12N

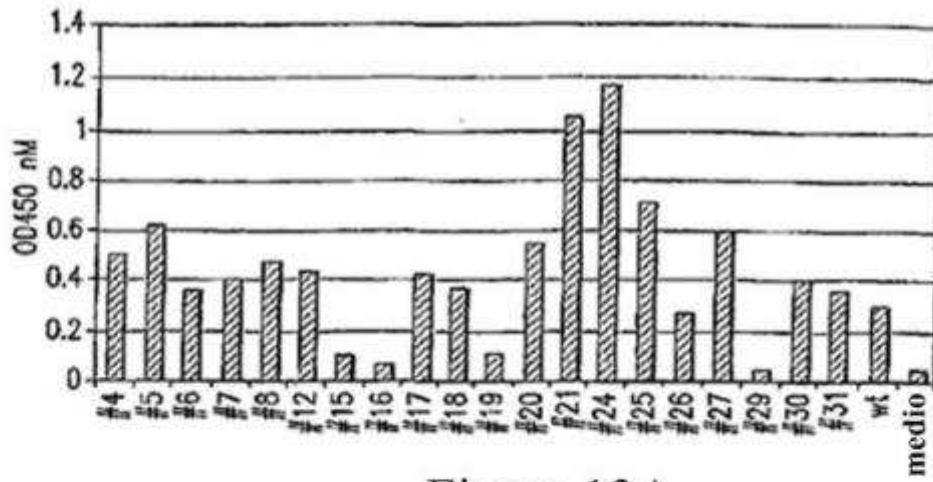


Figura 13A

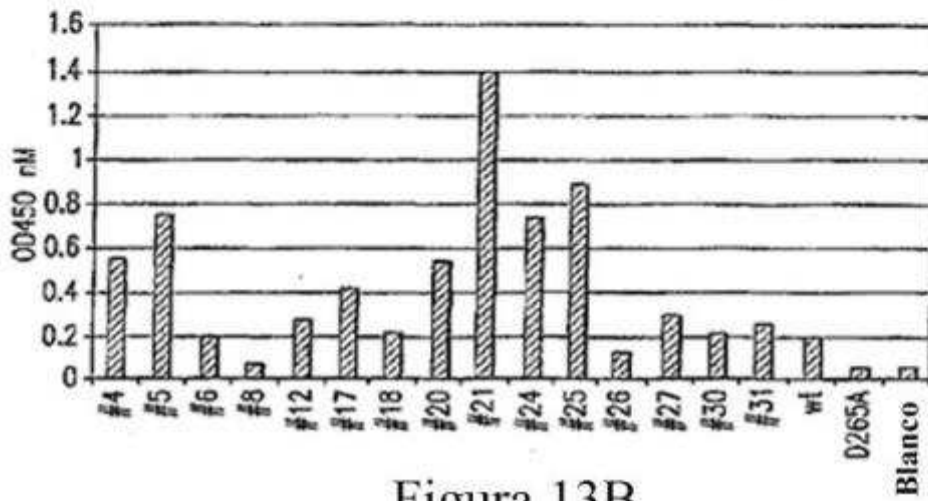


Figura 13B

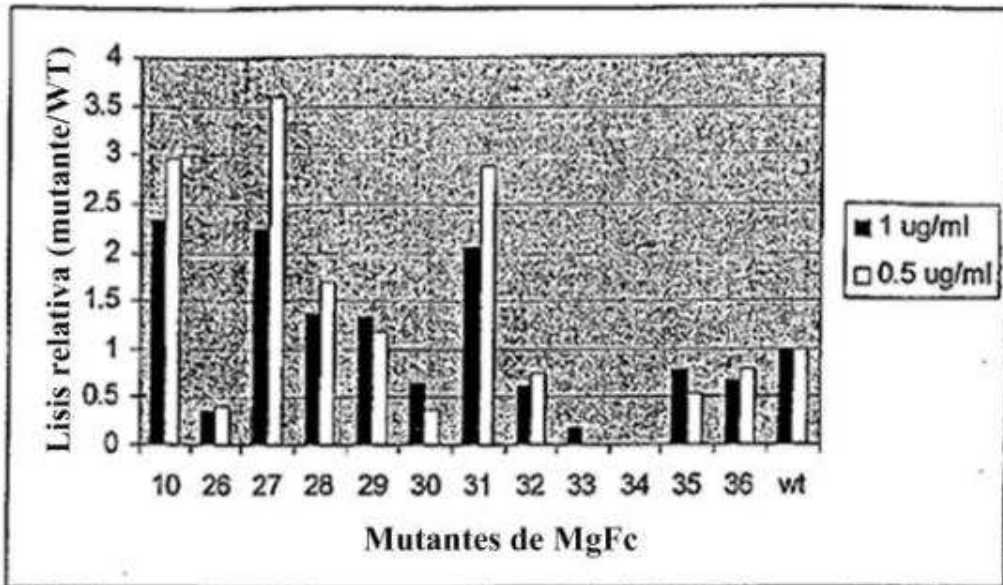


Figura 14

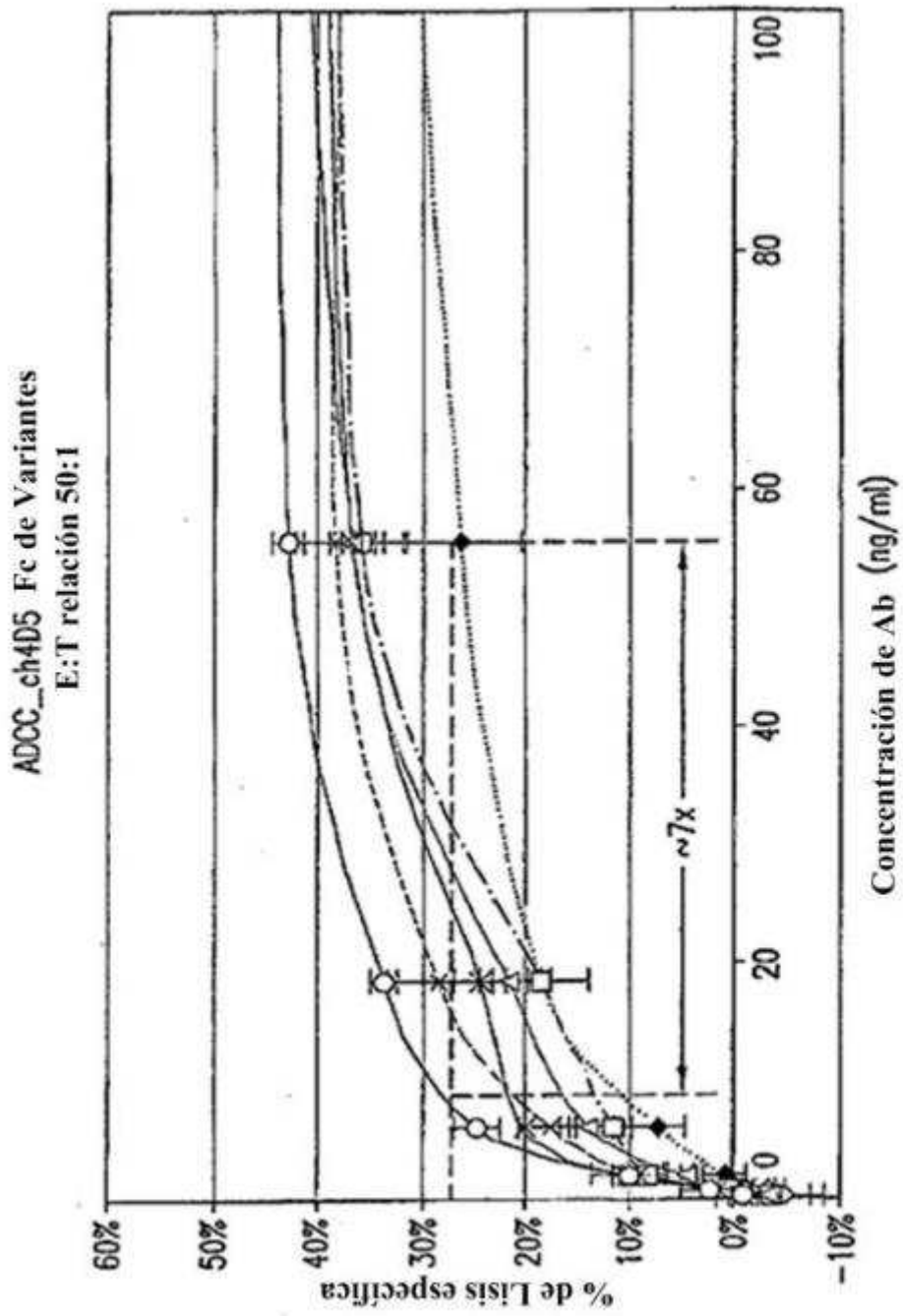


Figura 15A

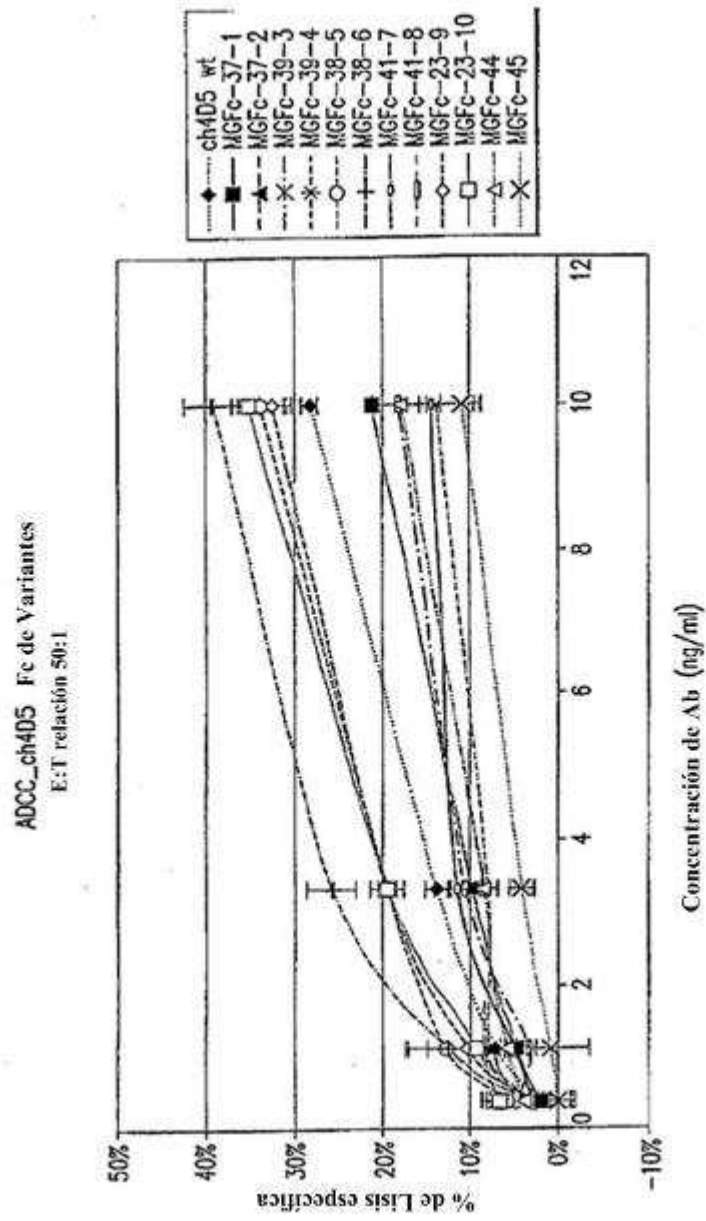


Figura 15B

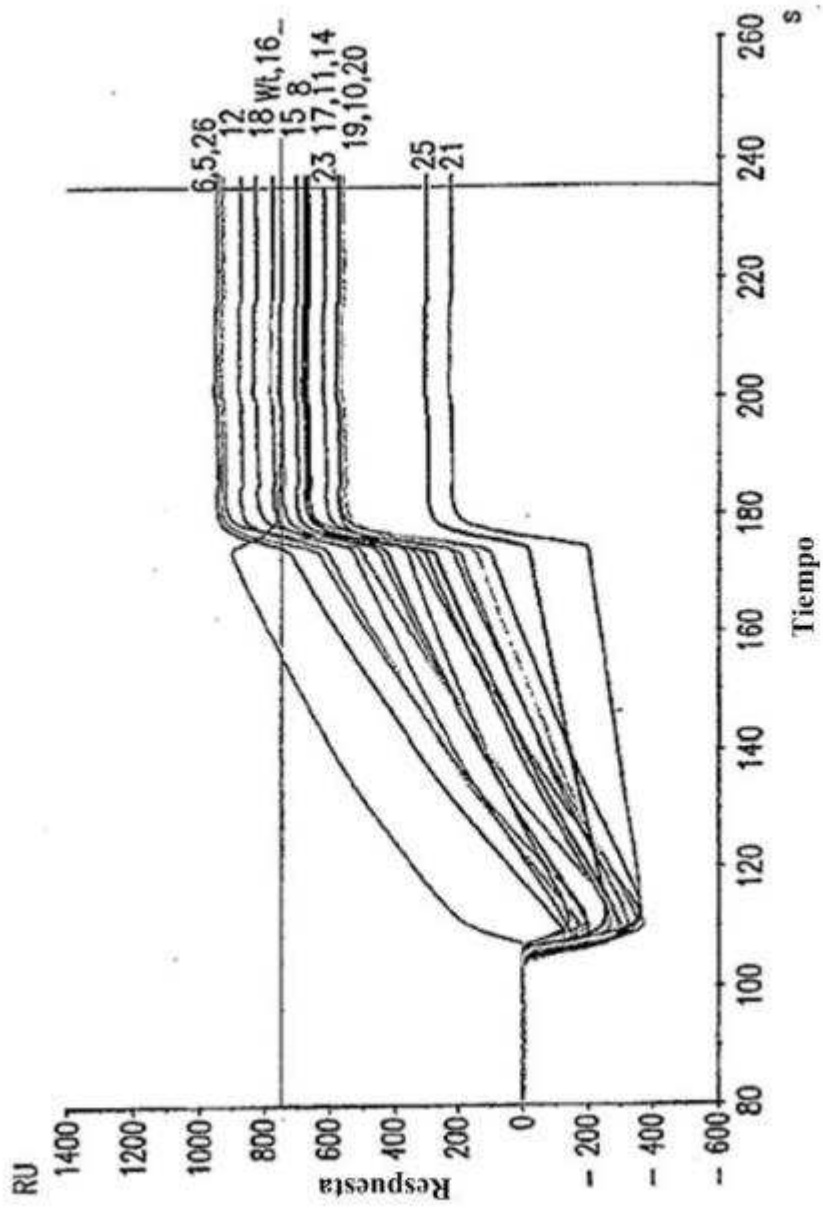


Figura 16

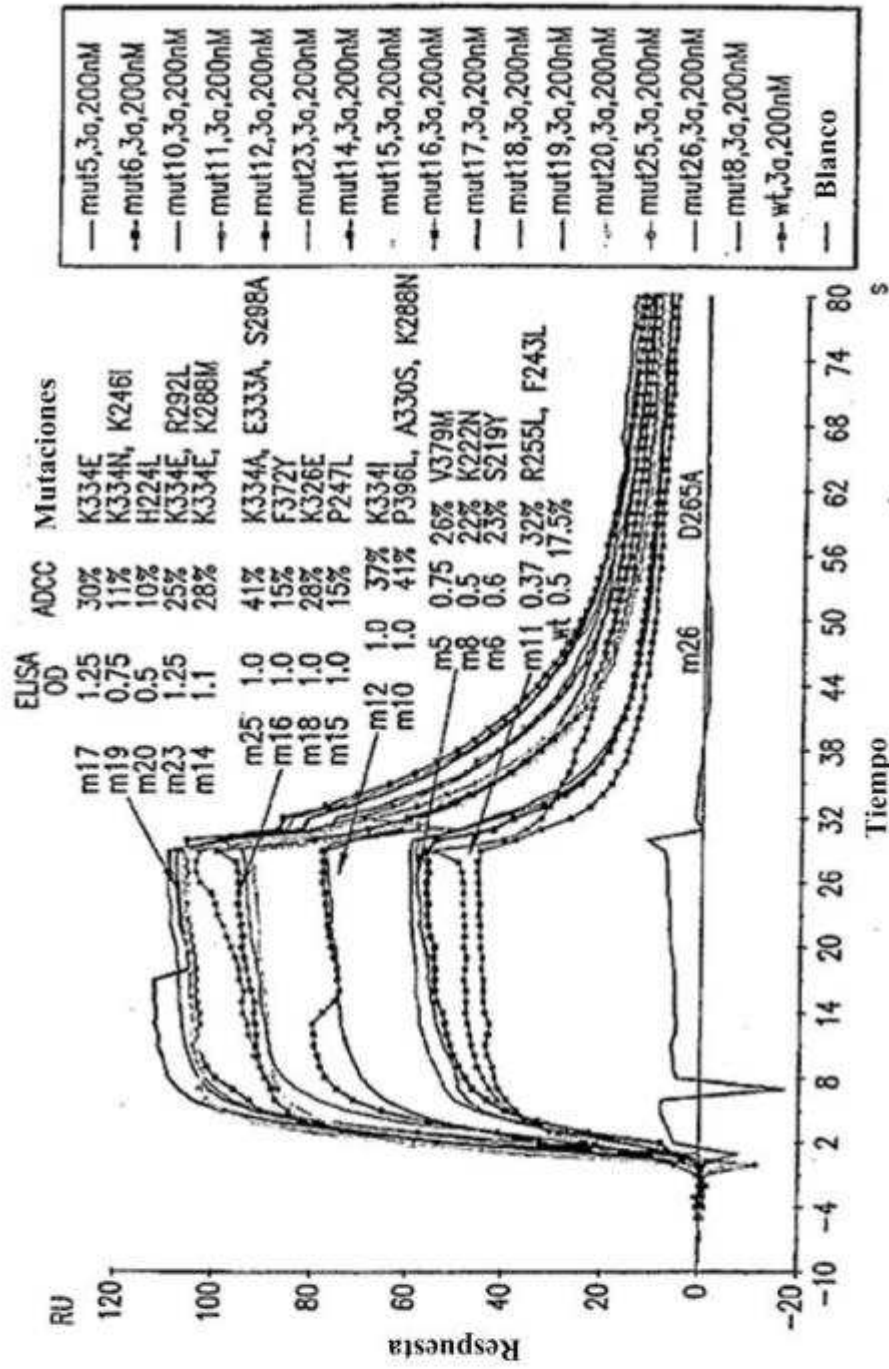


Figura 17

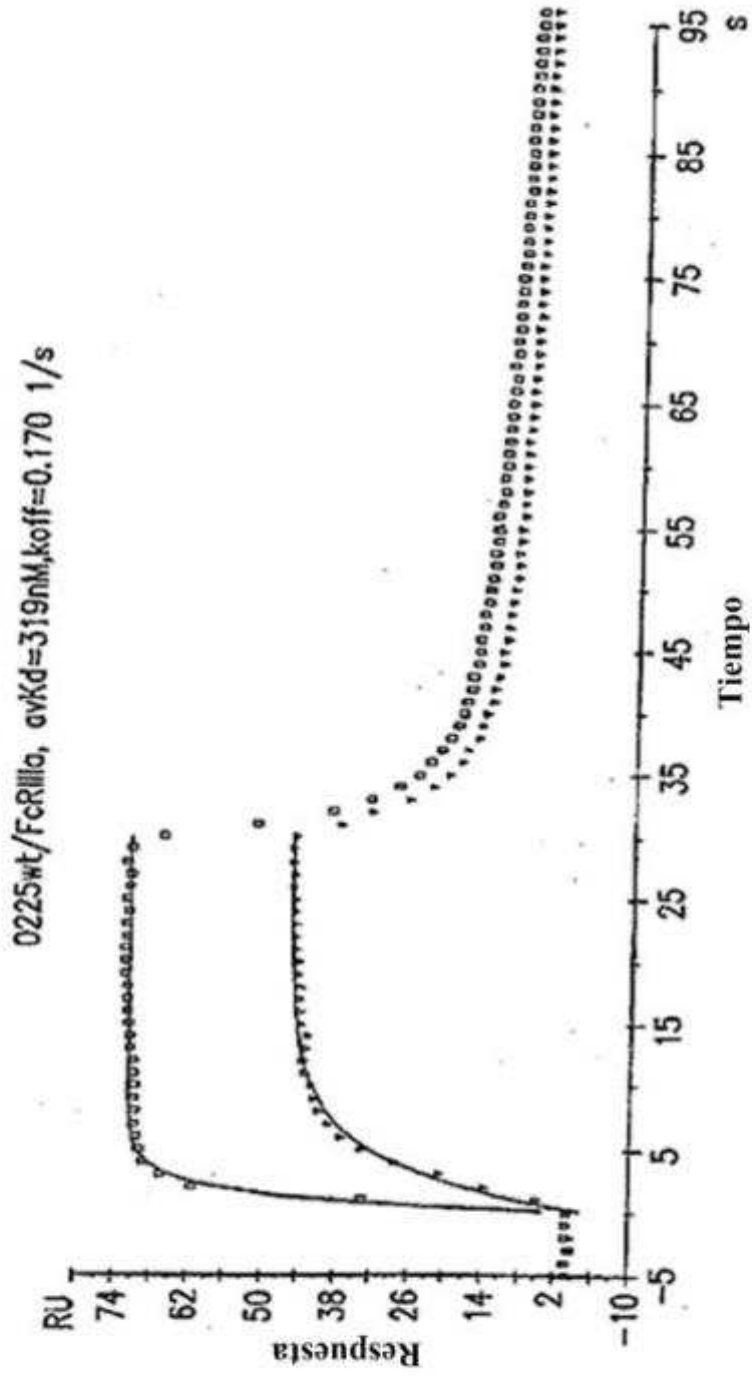


Figura 18A

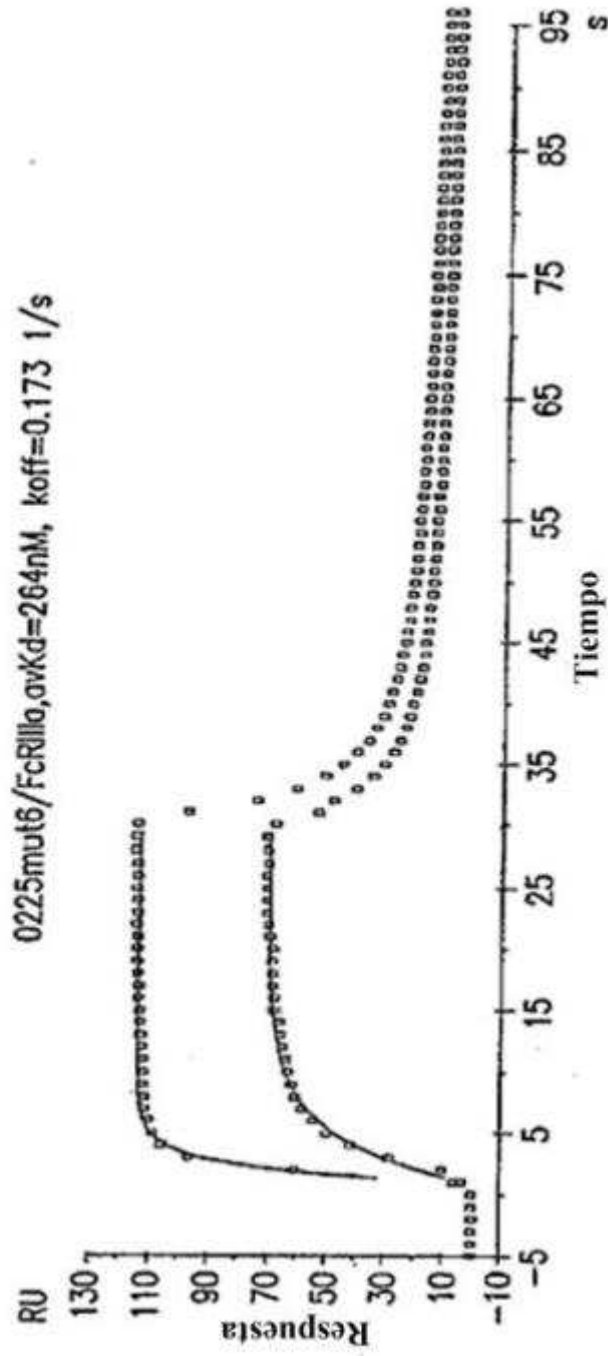


Figura 18B

0225mut10/FcRIIIa,avKd=128nM,koff=0.115 1/s

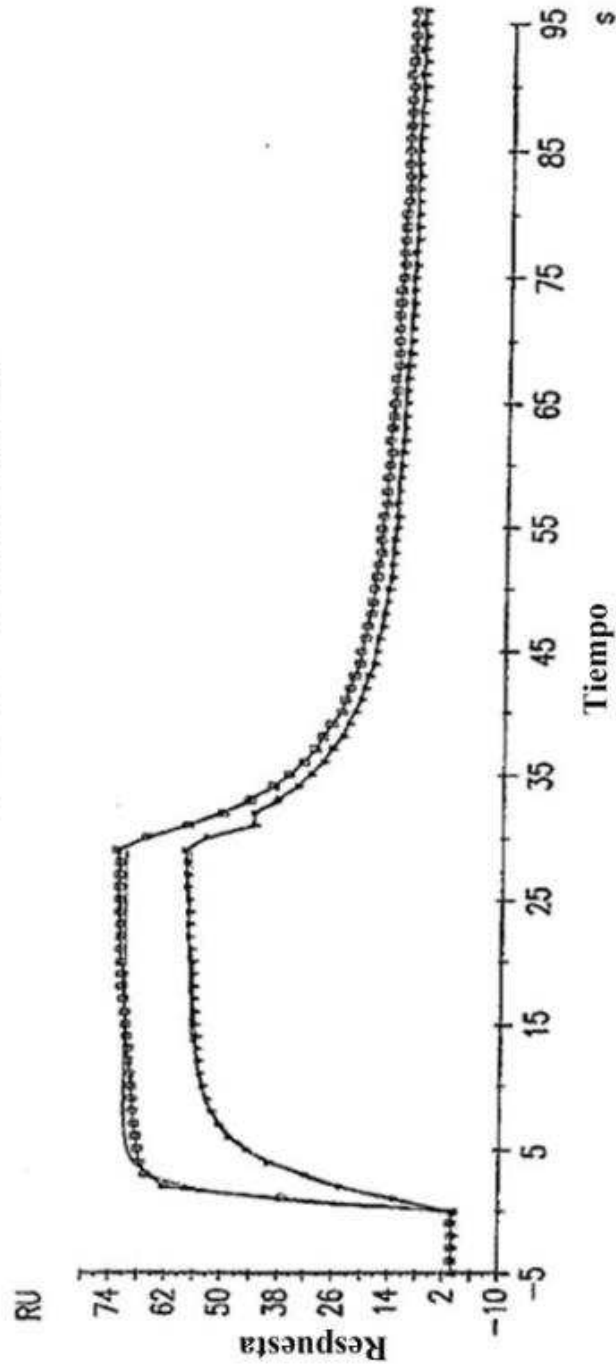


Figura 18C

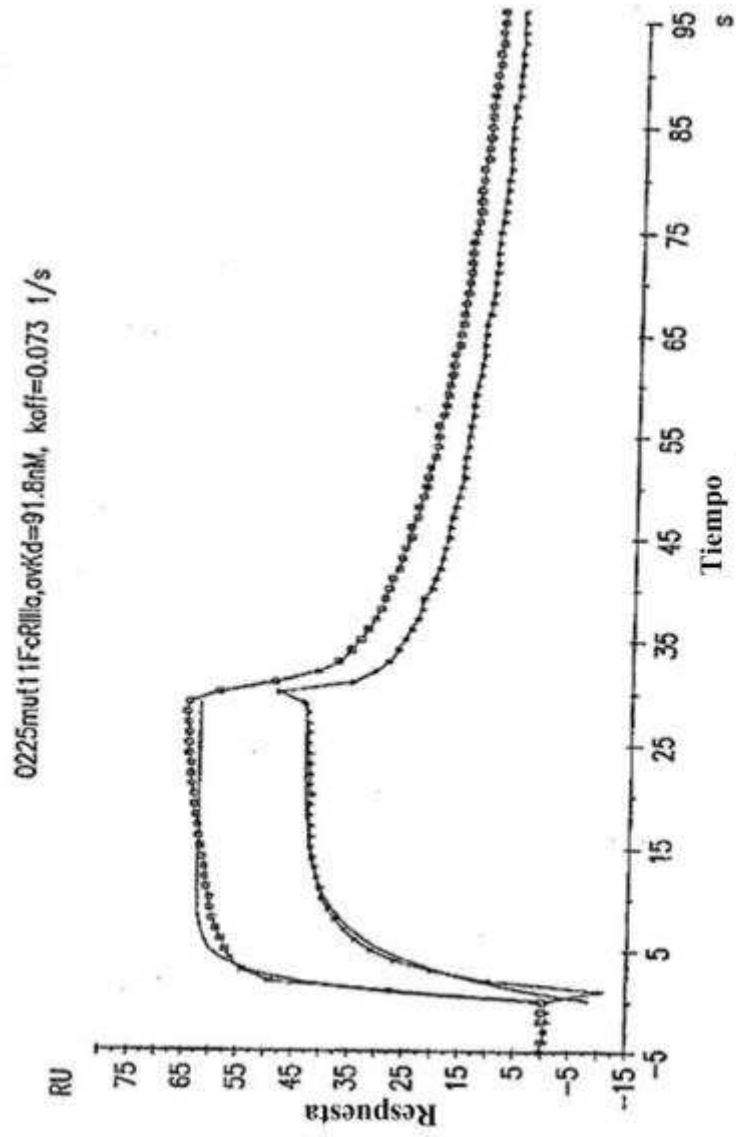


Figura 18D

0225mut18/FcRIIIa, σ vkD=92nM, koff=0.112 1/s

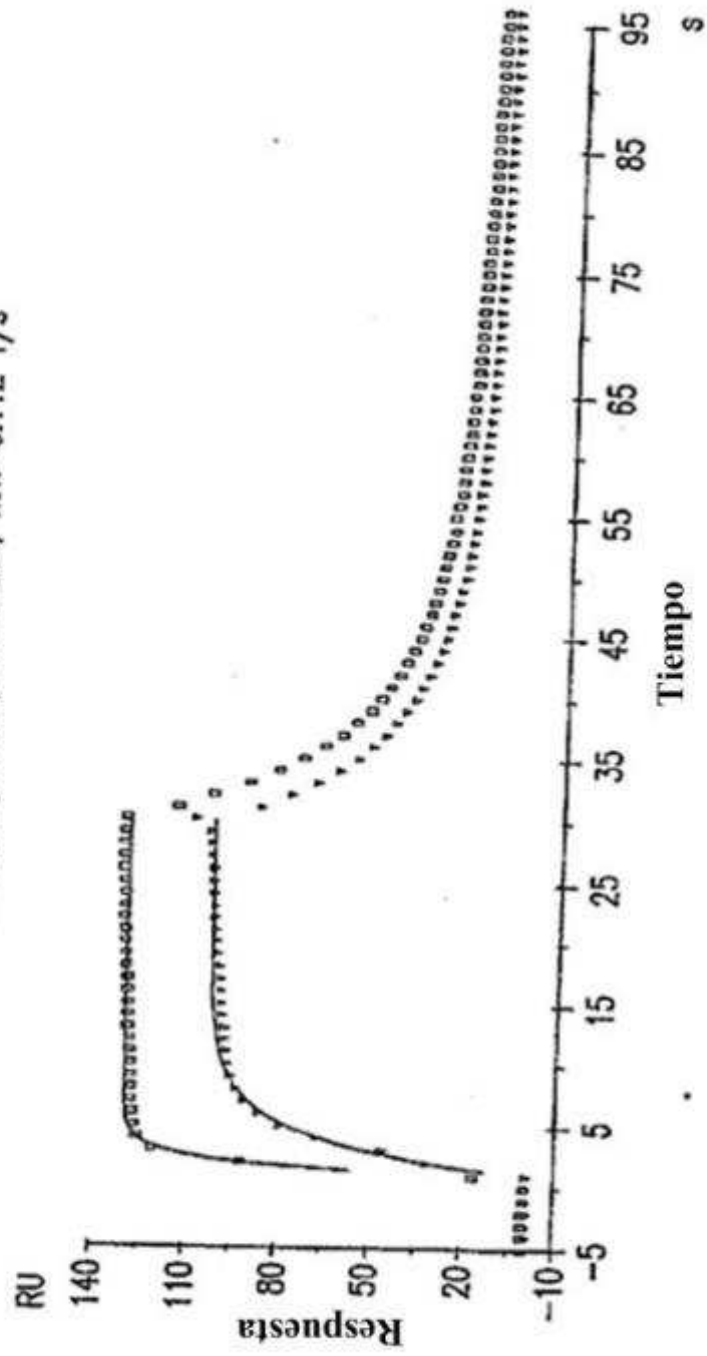


Figura 18E

0225mut14/FcR111a,avKd=75.4nM,koff=0.1 1/s

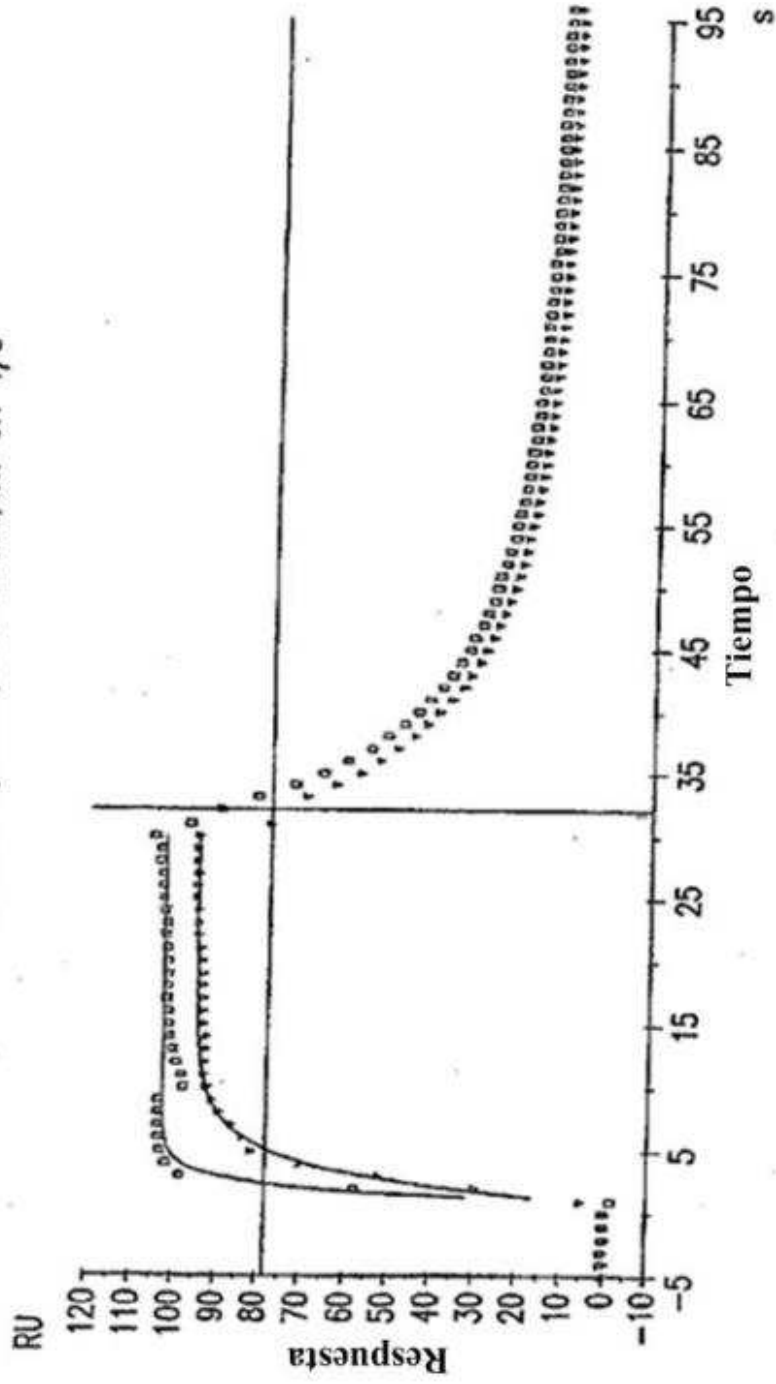


Figura 18F

0225mut16/FcR1IIa,avKd=84.8nM,koff=0.133 1/s

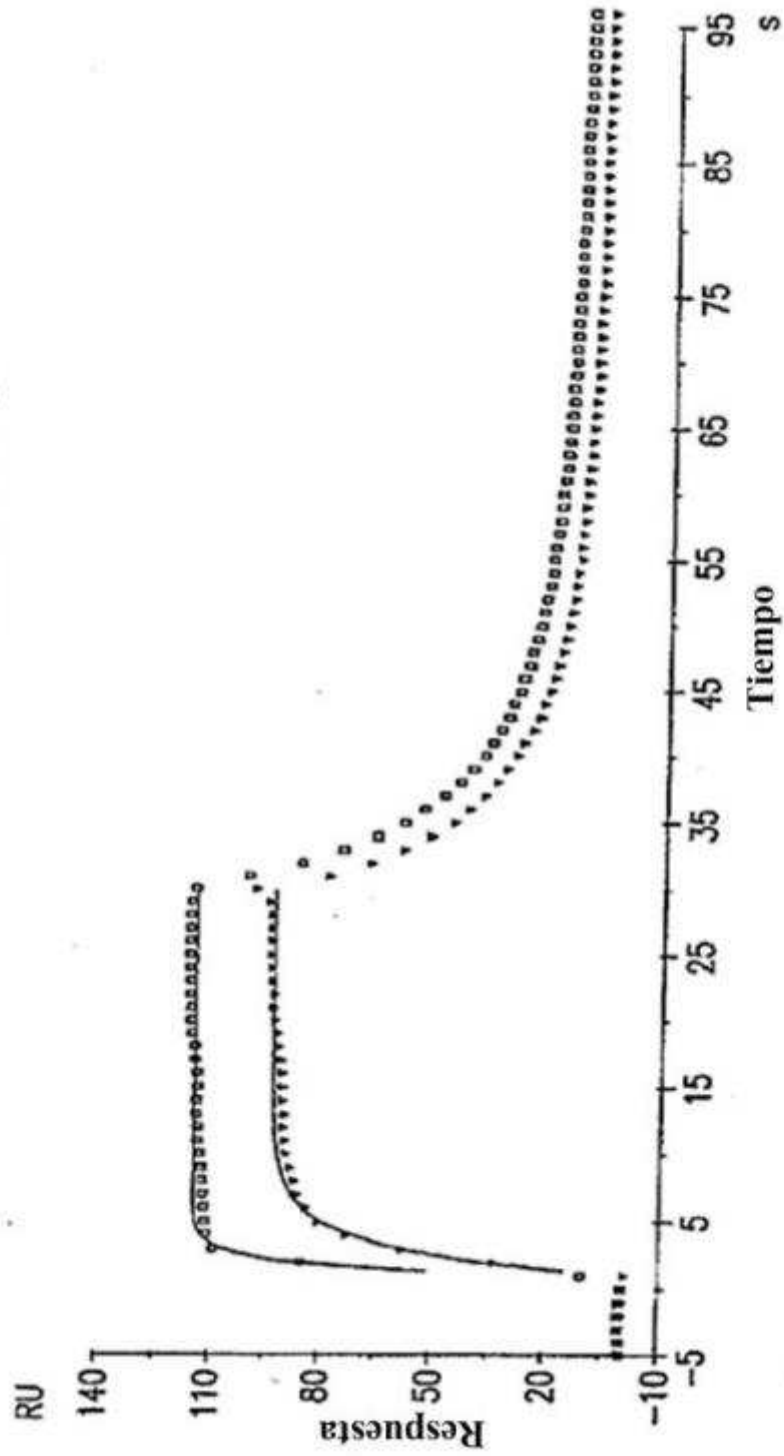


Figura 18G

0225mut19/FcRIIIa,avKd=100nM,koff=0.120 1/s

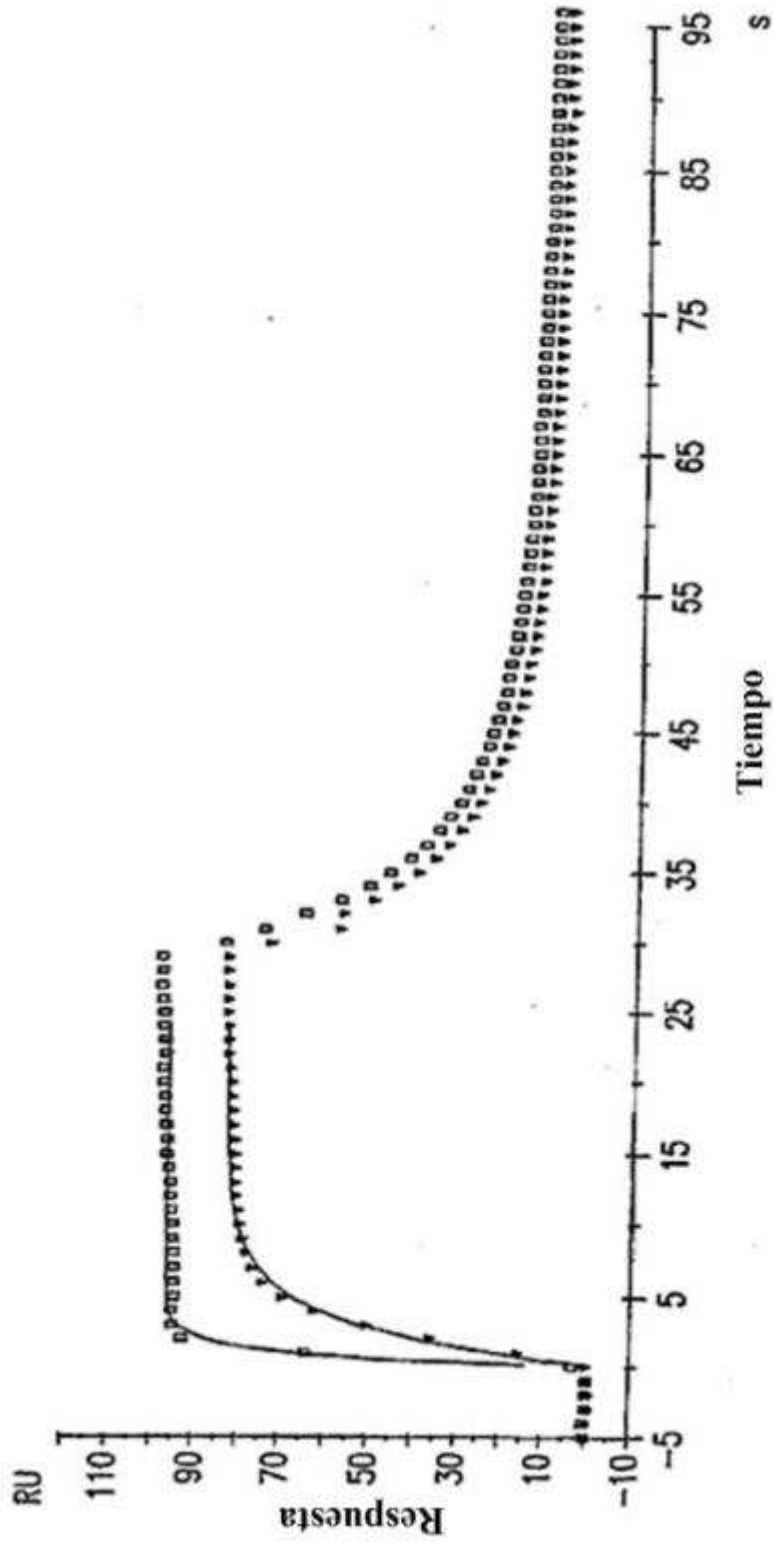


Figura 18H

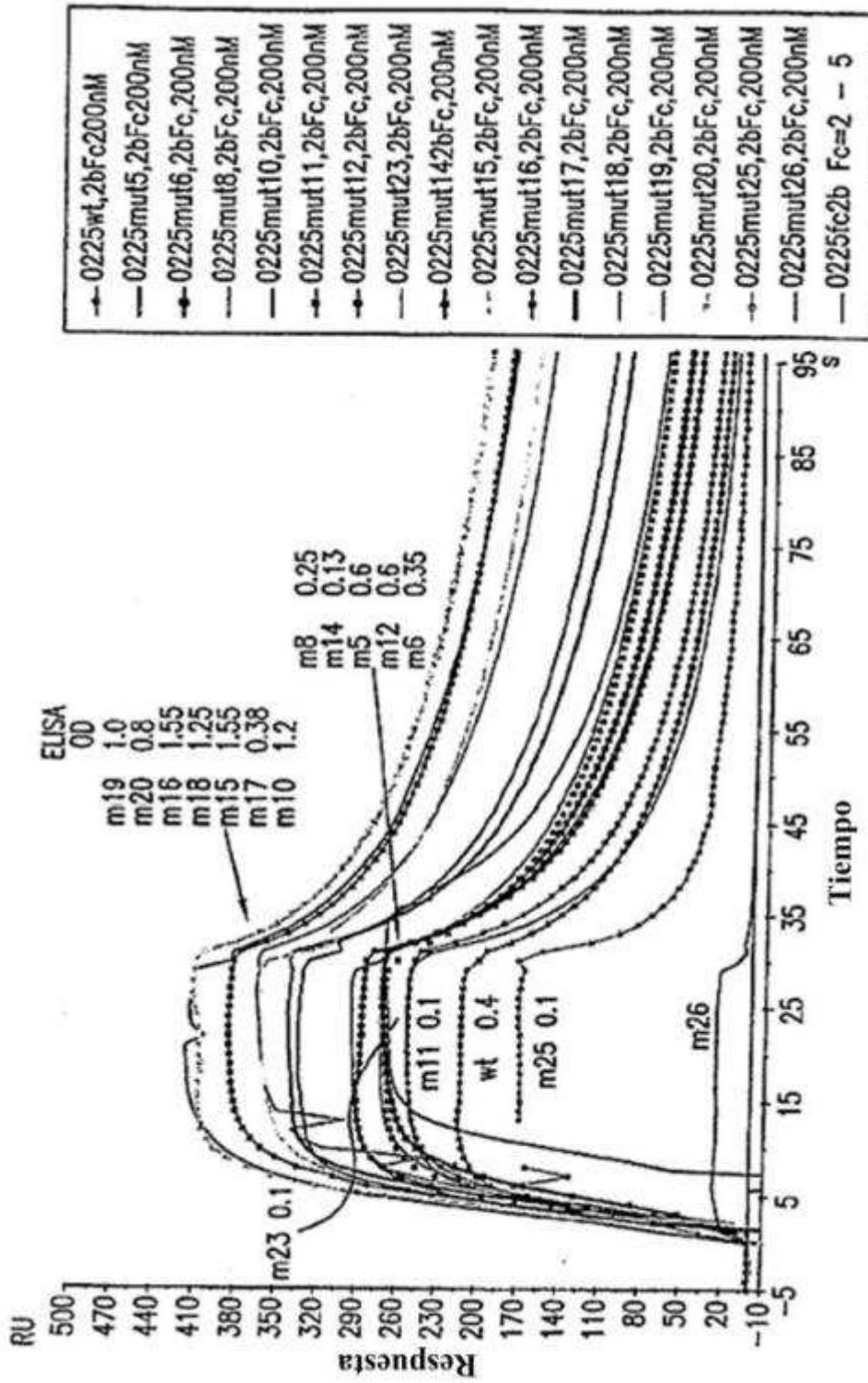


Figura 19

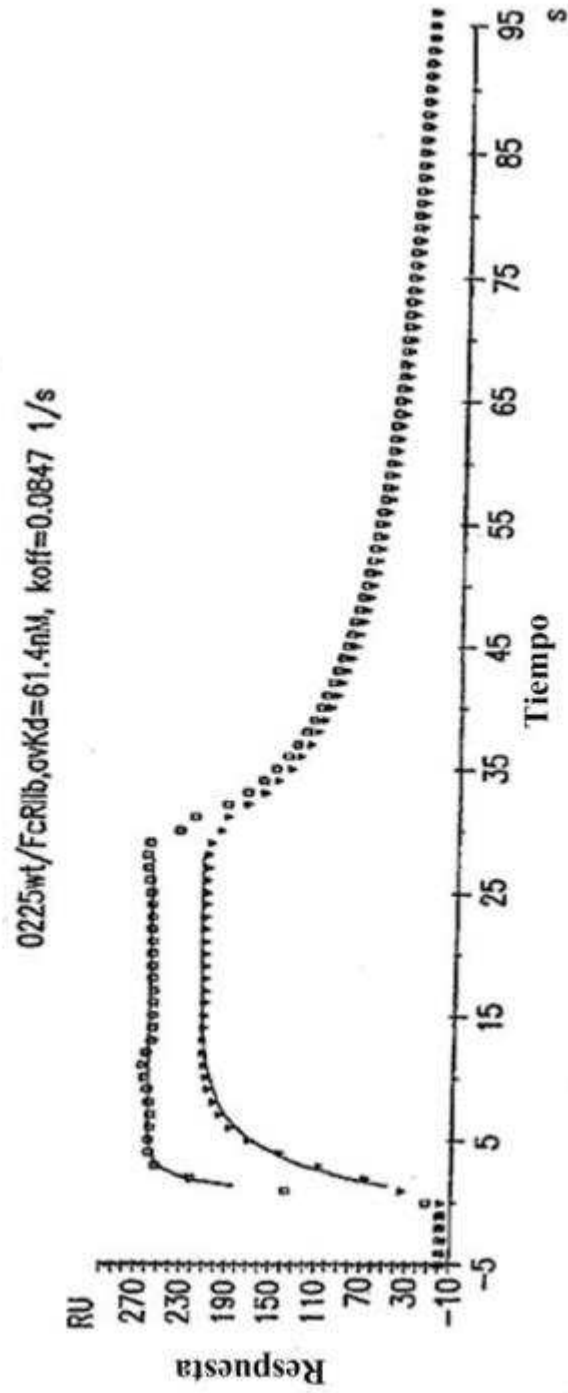


Figura 20A

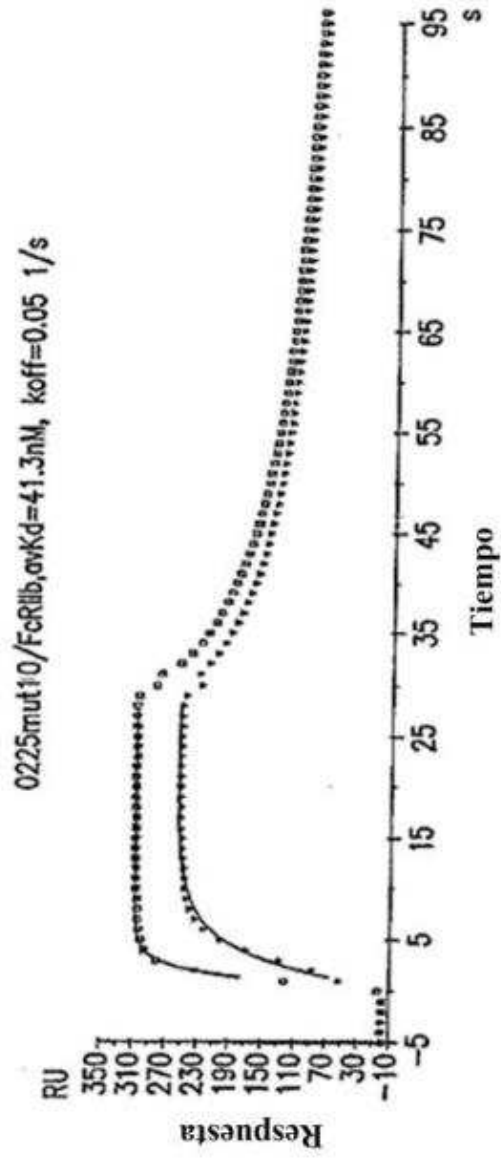


Figura 20B

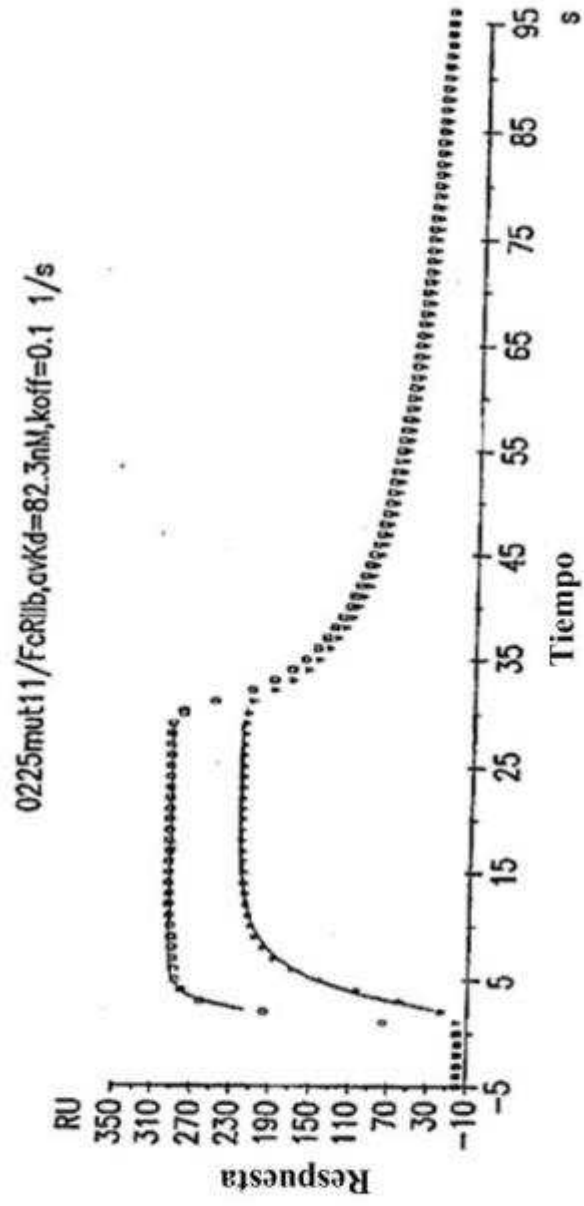


Figura 20C

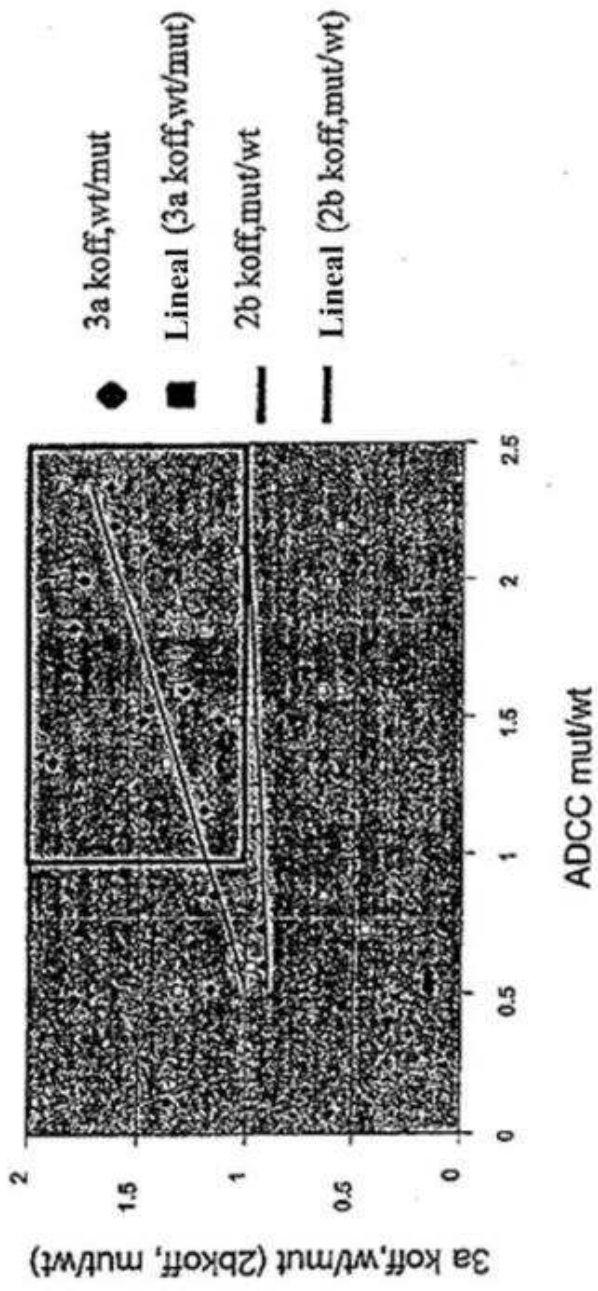


Figura 21

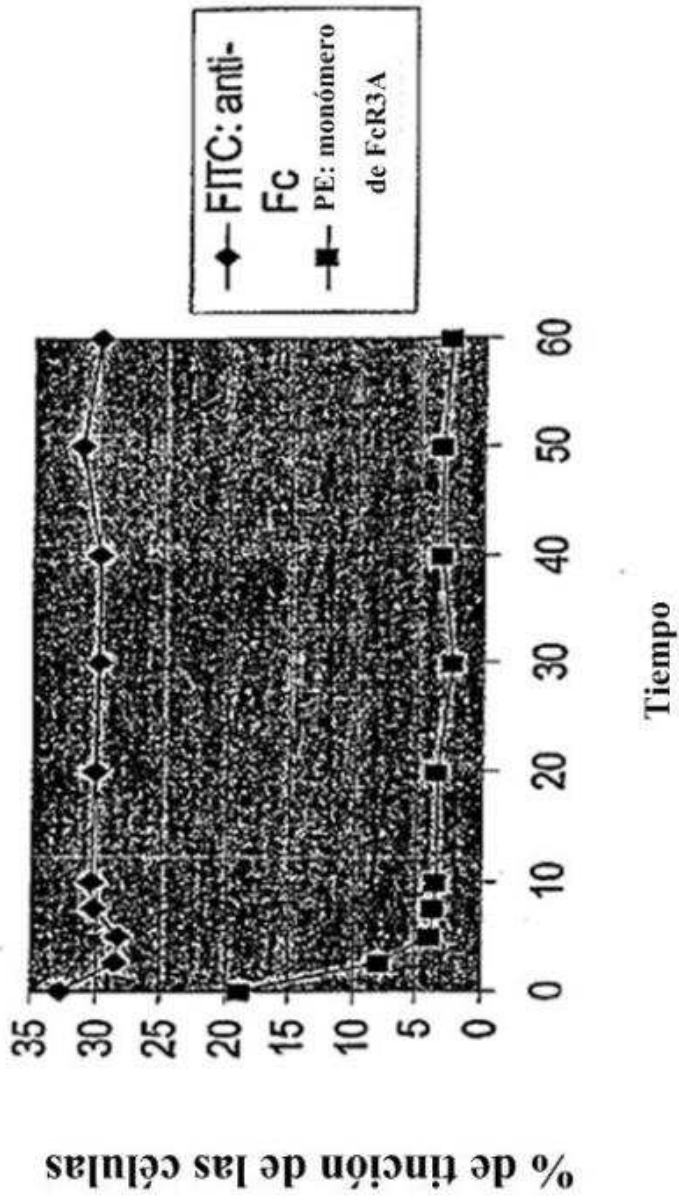


Figura 22

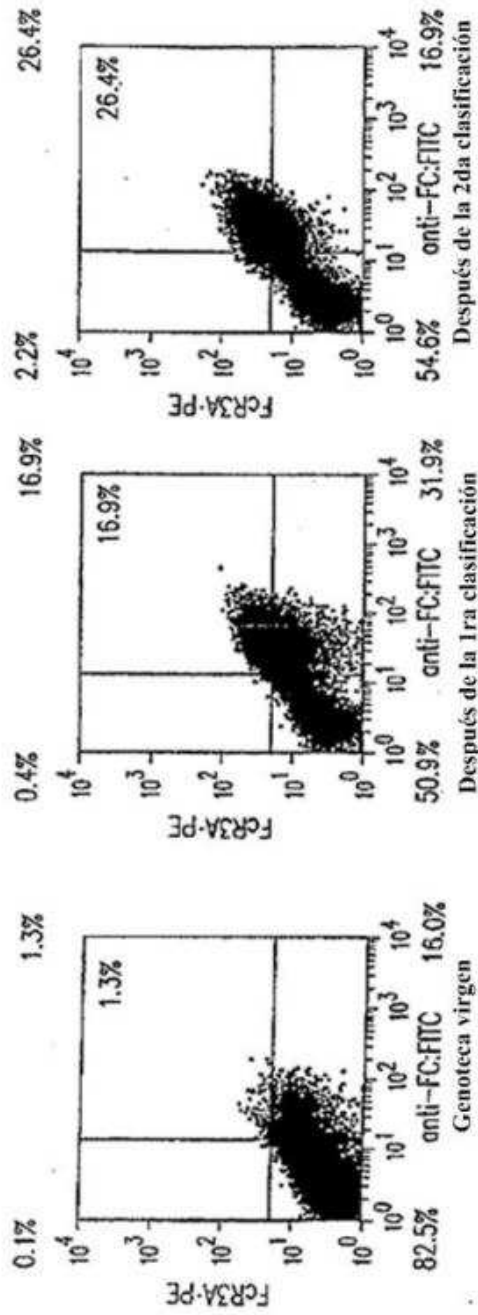


Figura 23A

Figura 23B

Figura 23C

3cLAVI(V158) P051

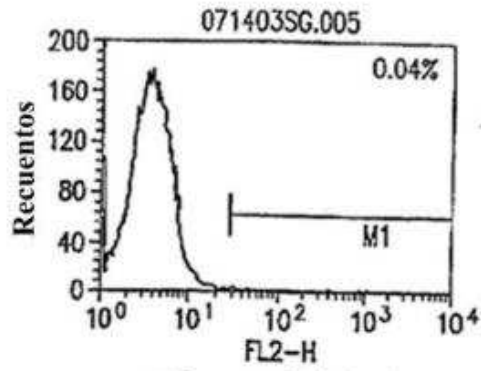


Figura 24A-1

3cLAVI(V158) P051

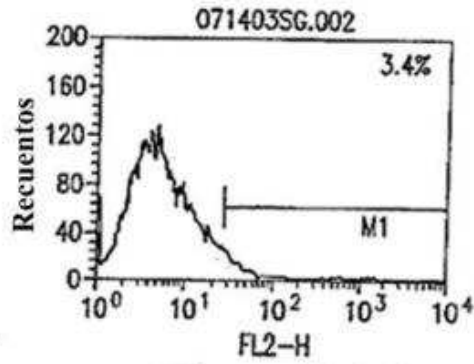


Figura 24A-2

3cLAVI(V158) P051

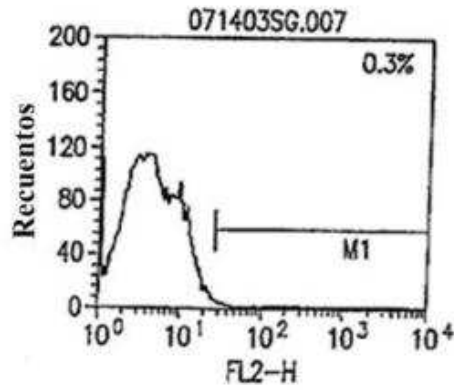


Figura 24A-3

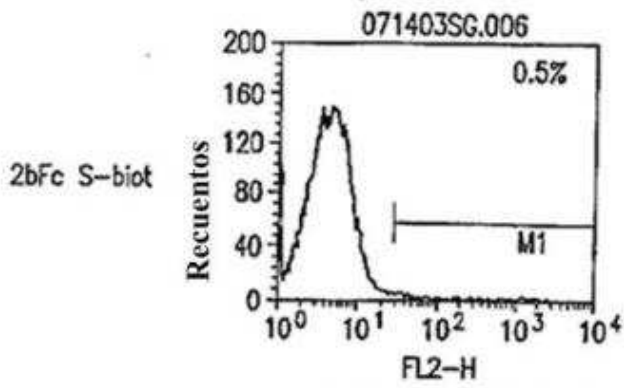


Figura 24A-4

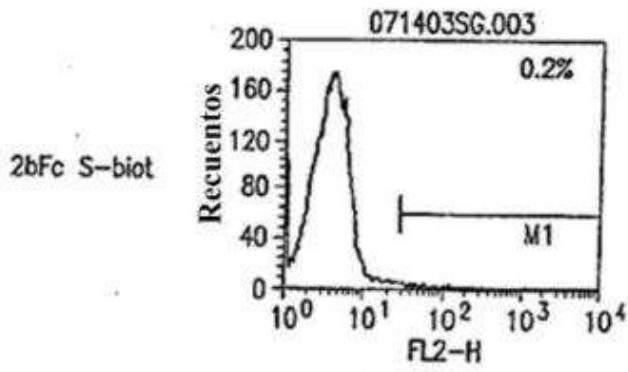


Figura 24A-5

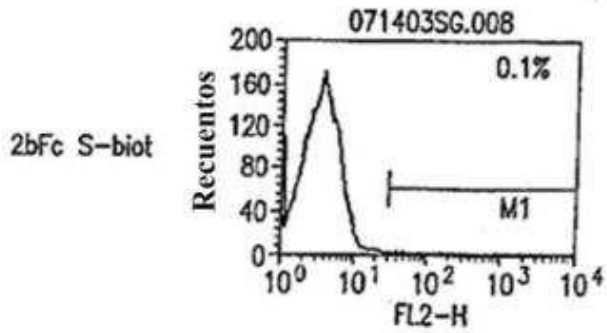


Figura 24A-6

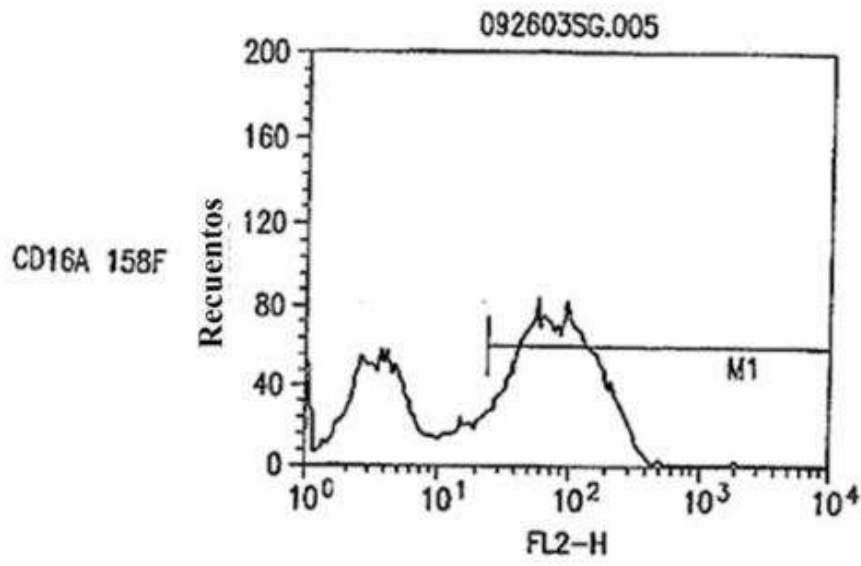


Figura 24B-1

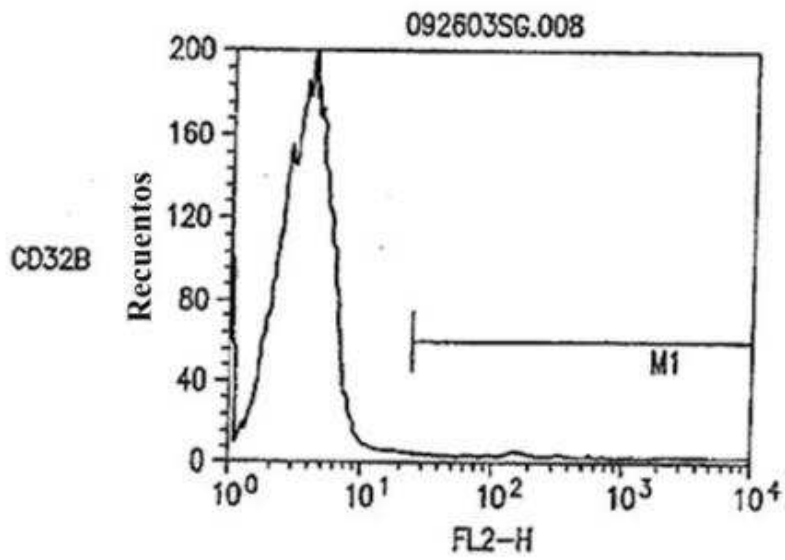


Figura 24B-2

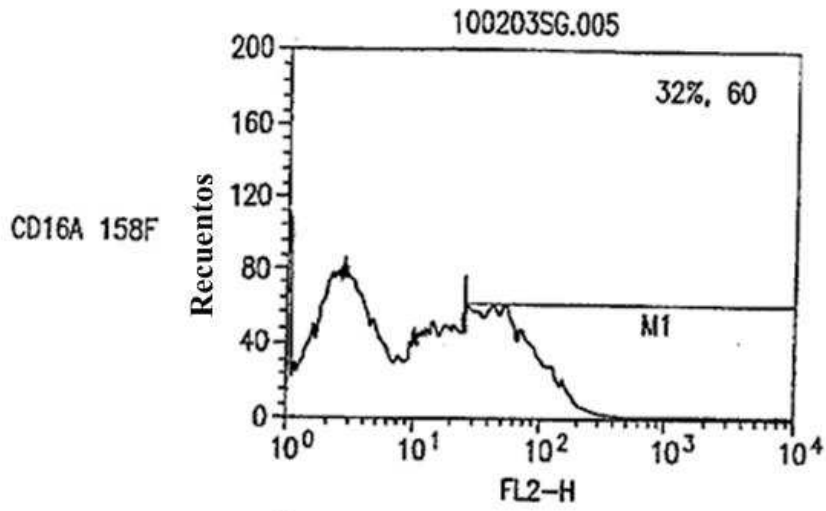


Figura 24B-3

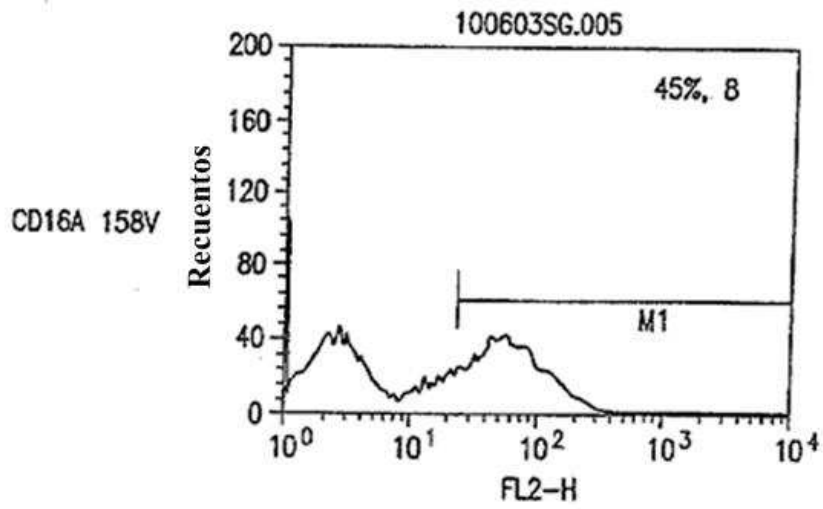


Figura 24B-4

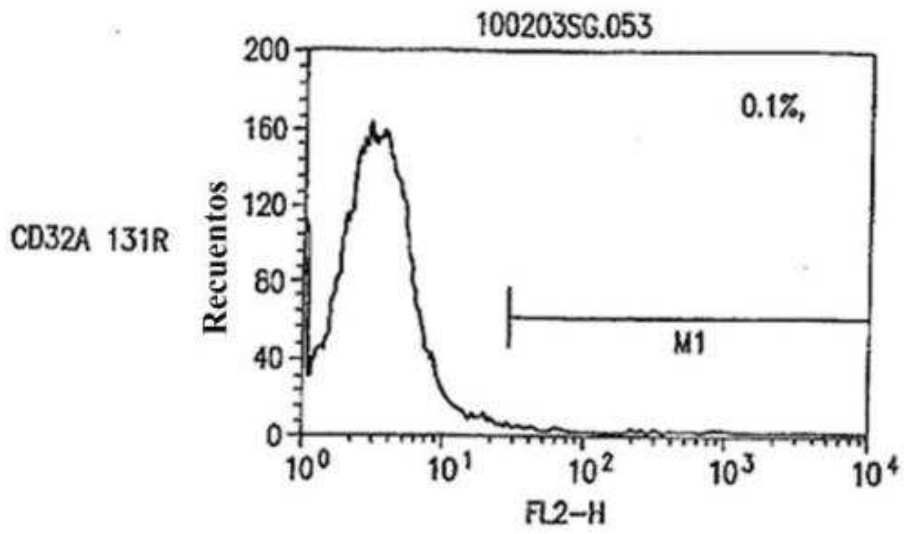


Figura 24B-5

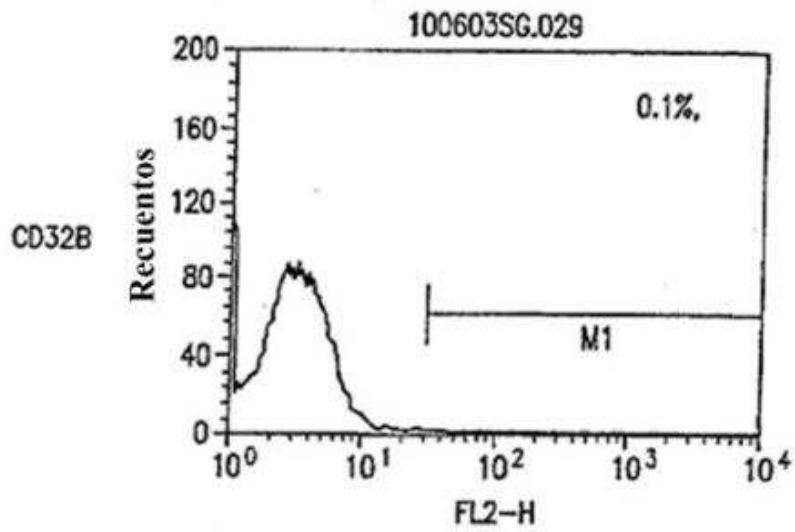


Figura 24B-6

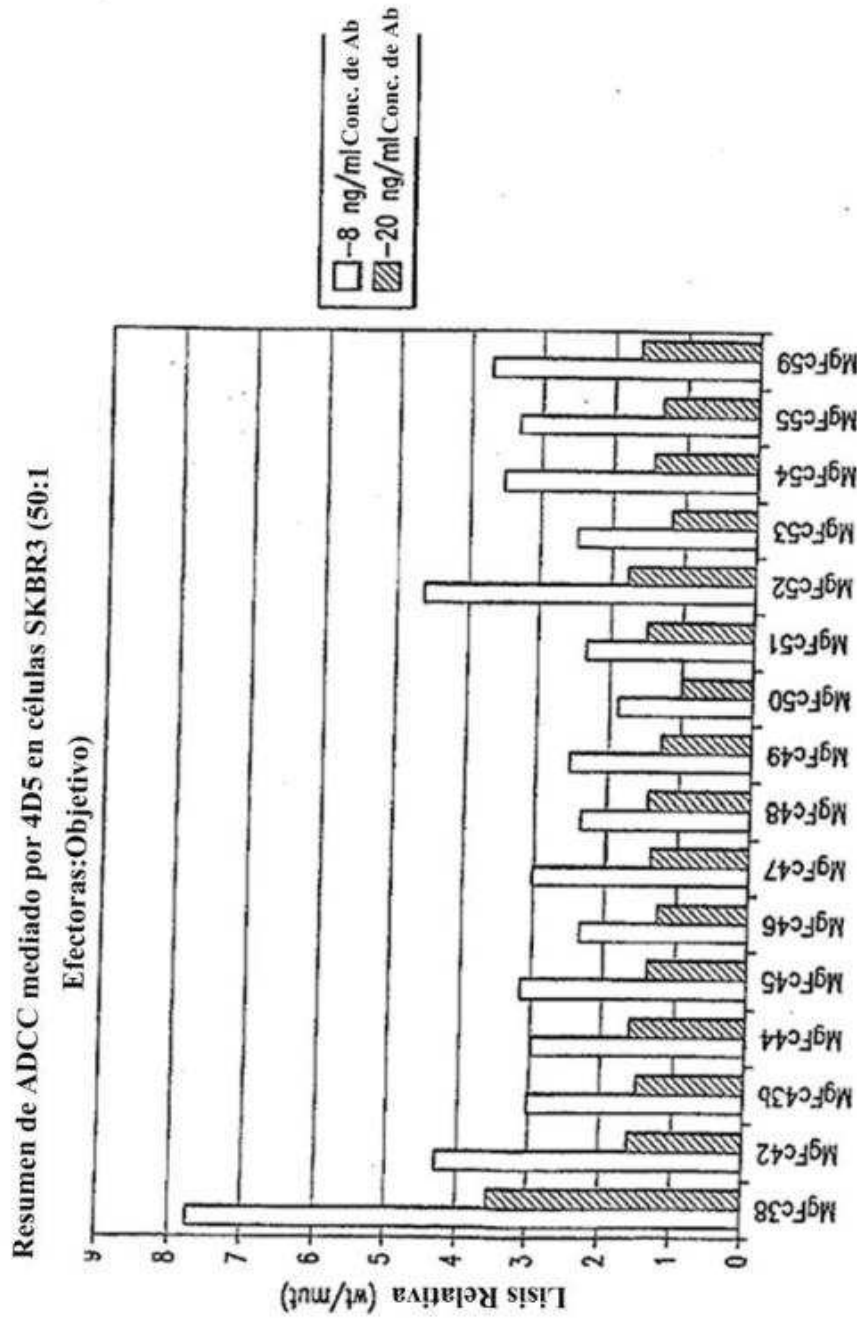


Figura 25

Resumen de ADCC mediado por 2H7 en células Daudi

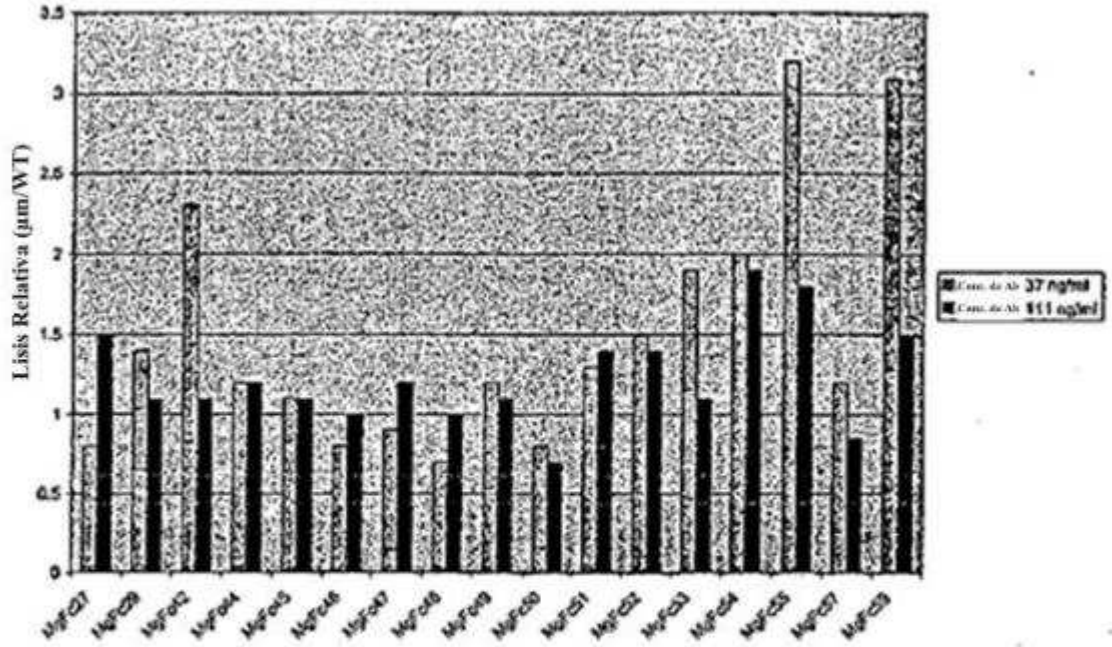


Figura 26

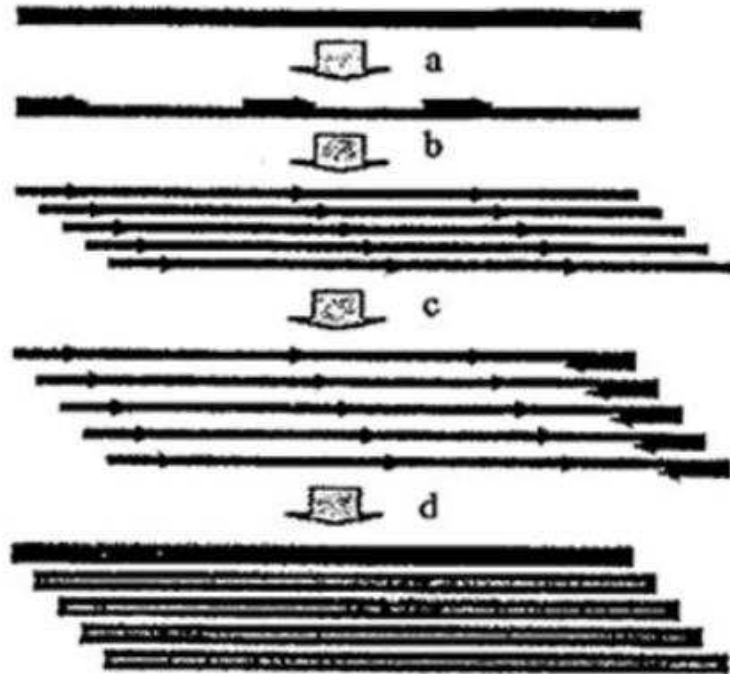


Figura 27

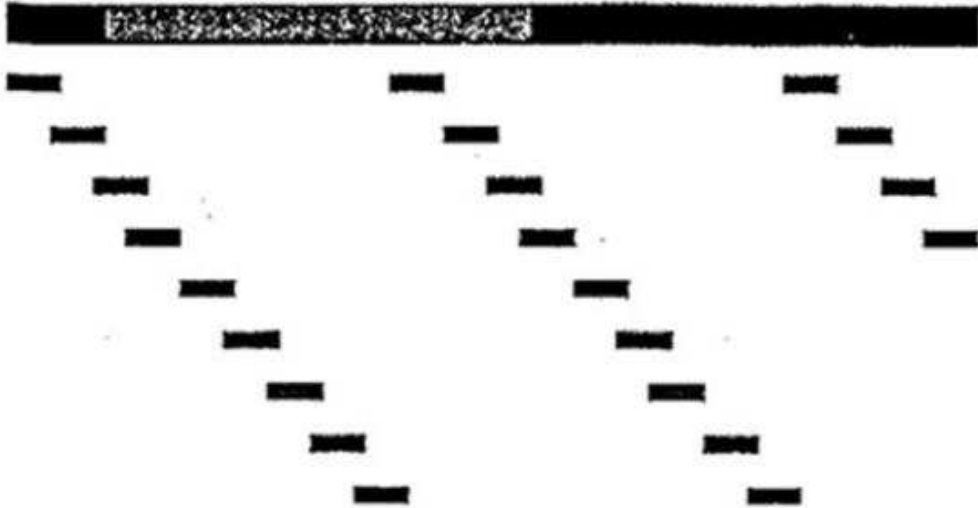


Figura 28

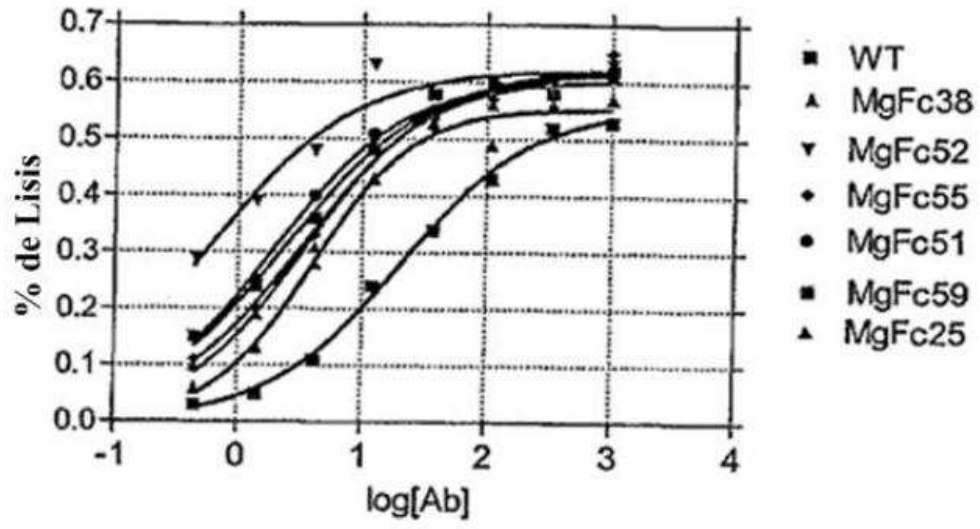


Figura 29

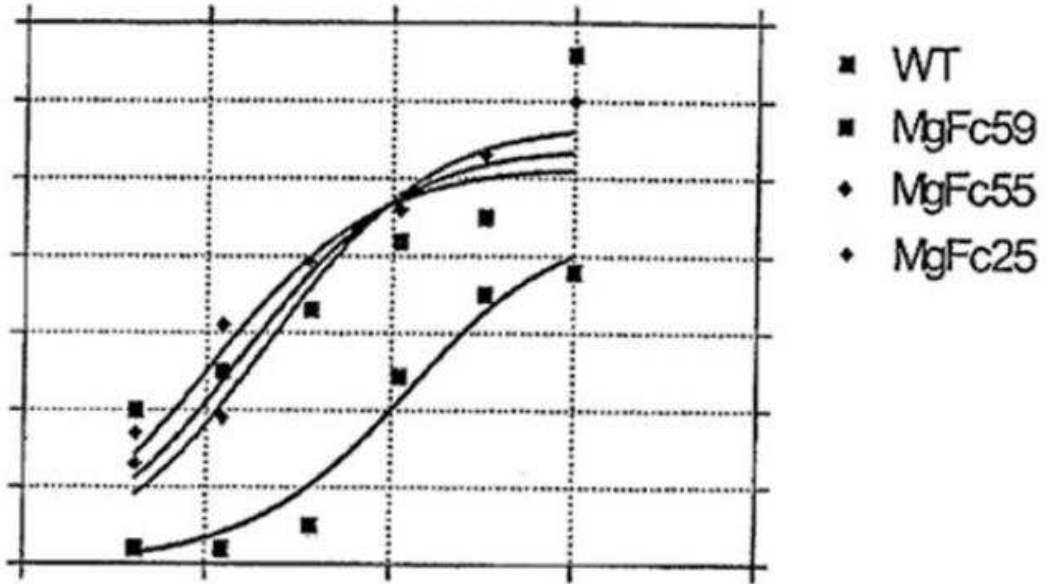


Figura 30

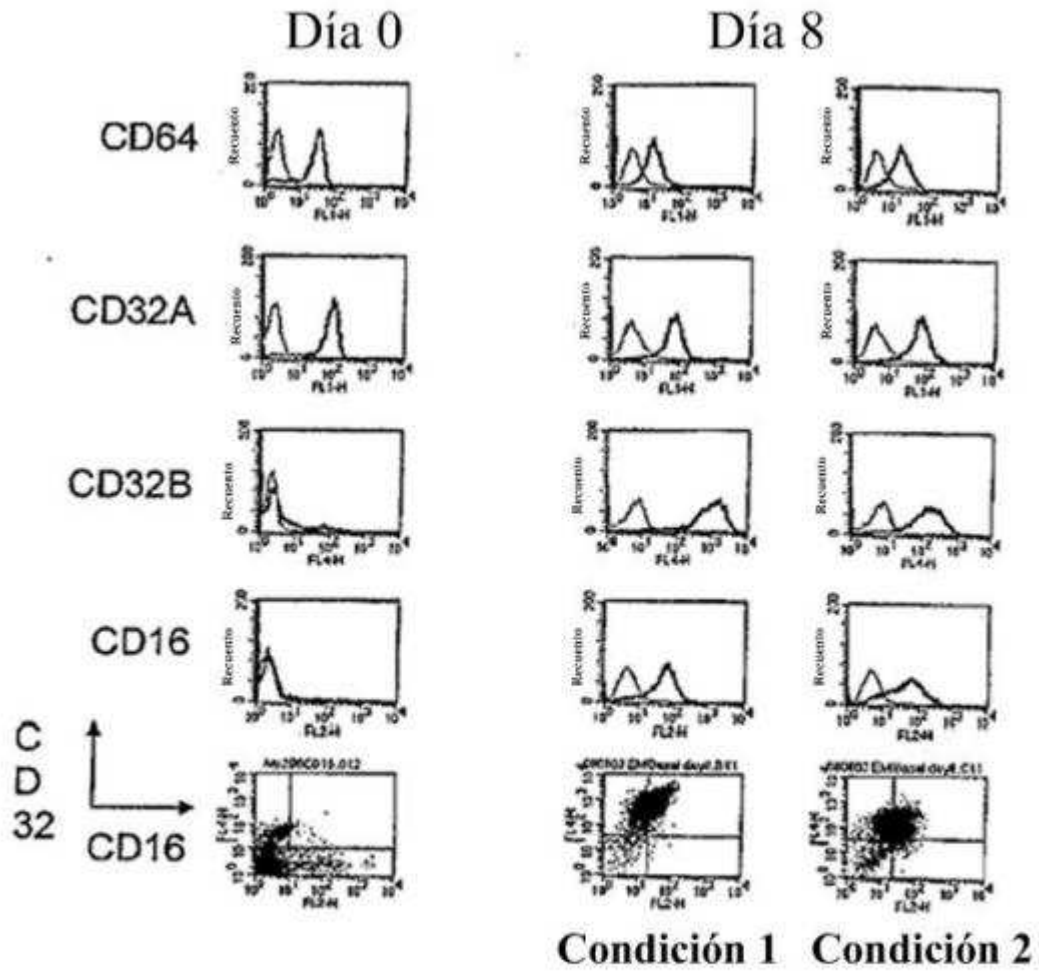


Figura 31

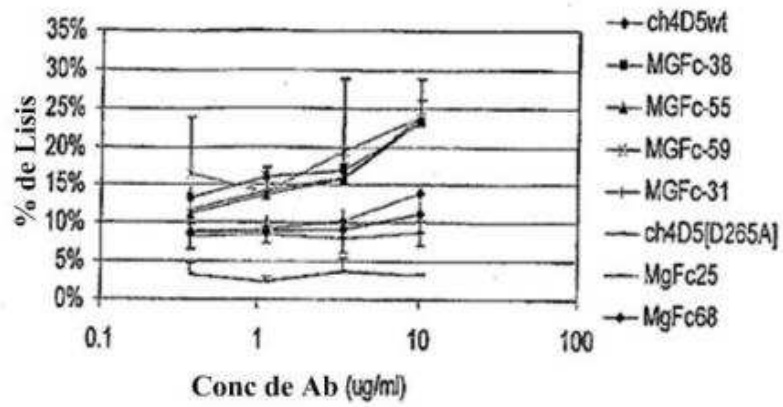


Figura 32

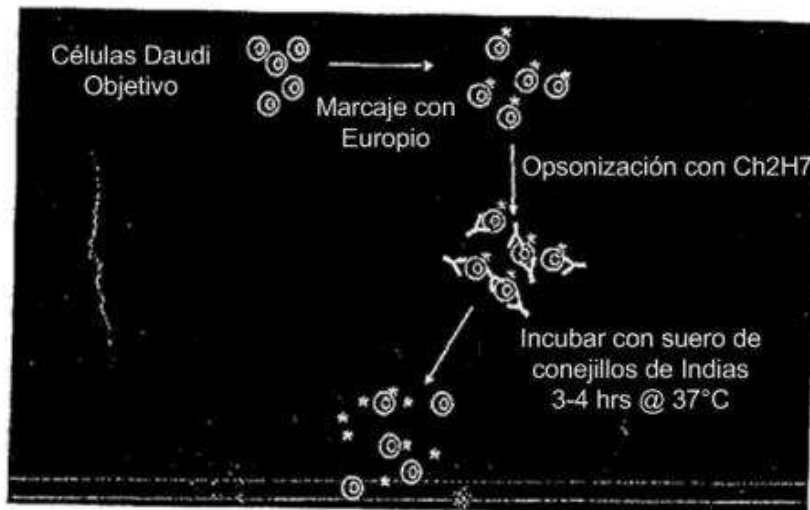


Figura 33

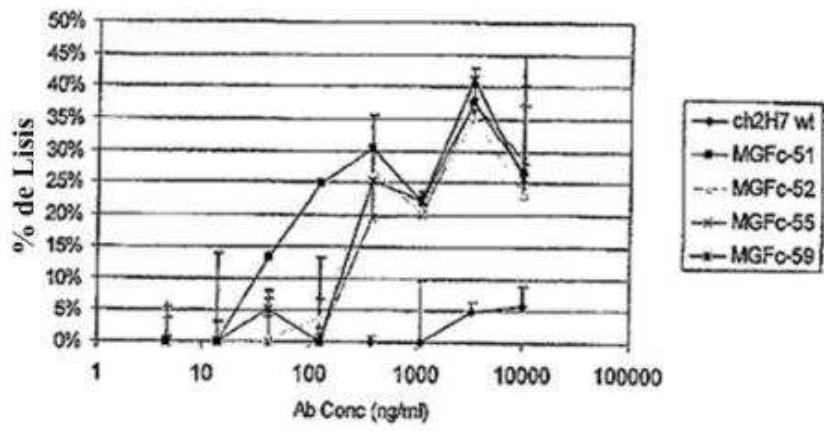


Figura 34

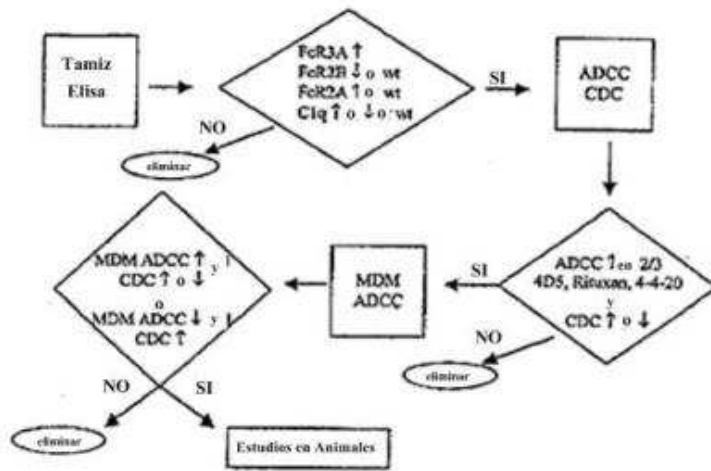


Figura 35

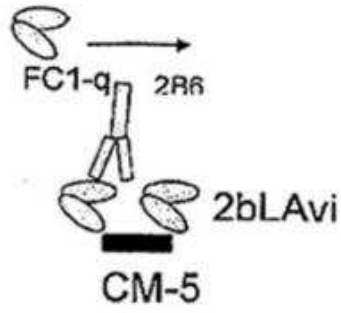


Figura 36A

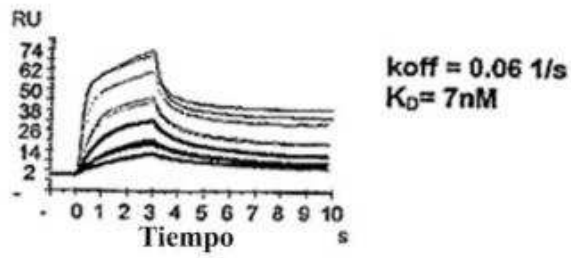
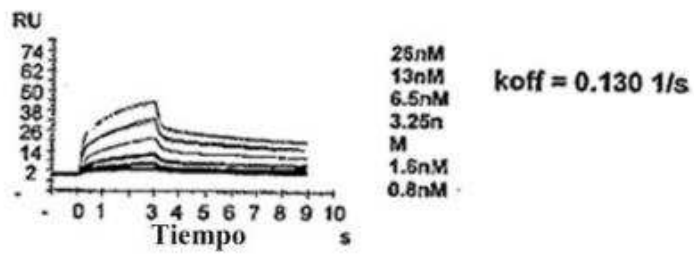


Figura 36B

Figura 37A

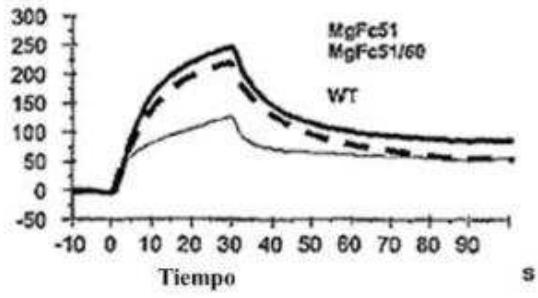


Figura 37B

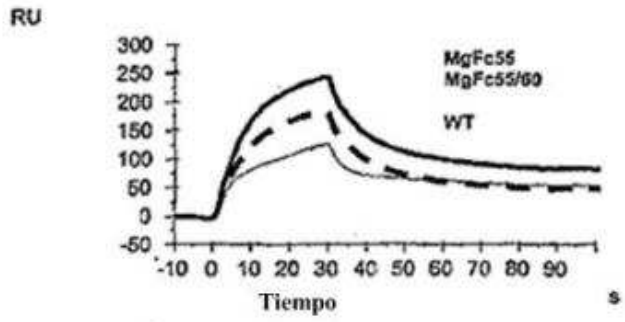


Figura 37C

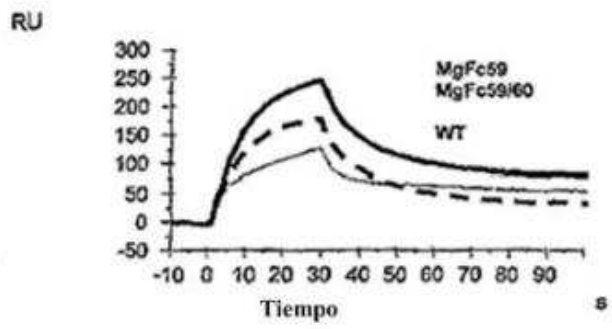


Figura 37D

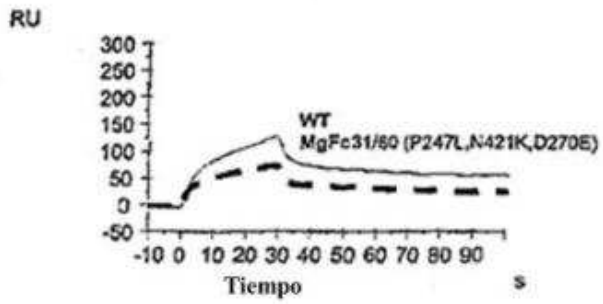


Figura 38A

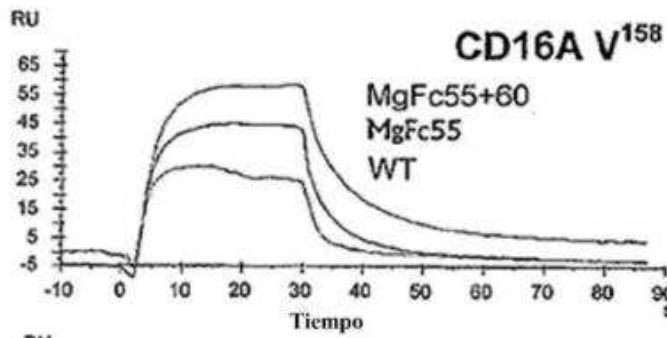


Figura 38B

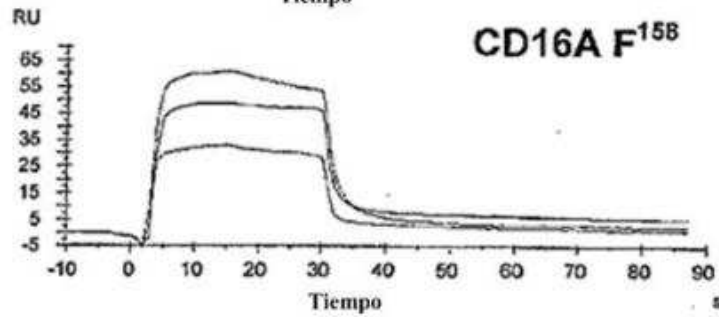


Figura 38C

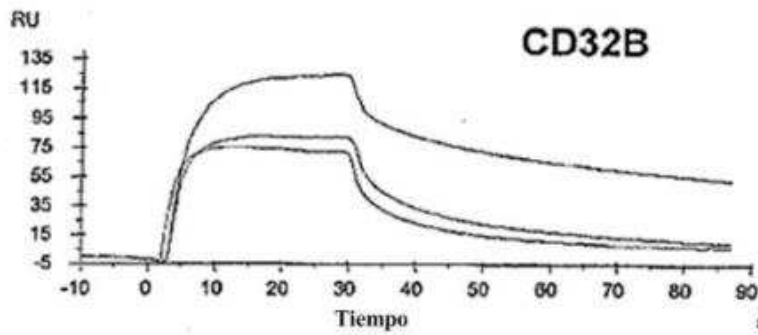


Figura 38D

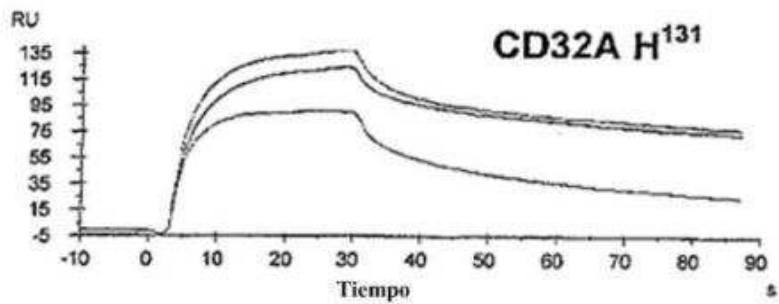


Figura 39A

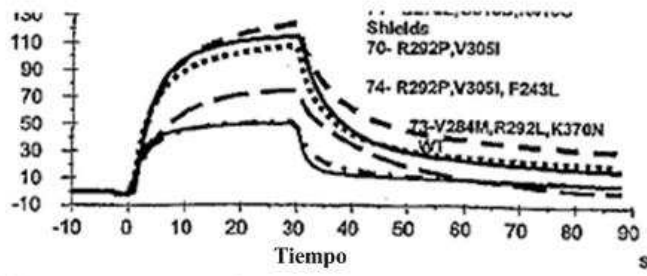


Figura 39B

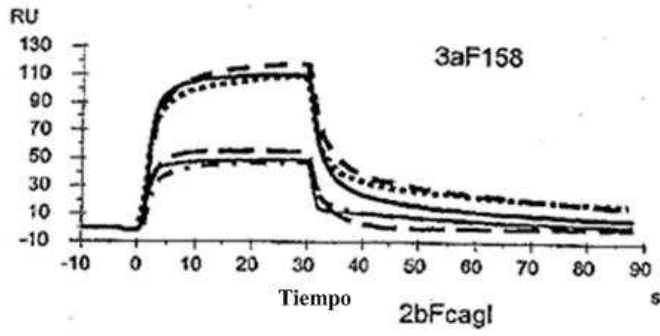


Figura 39C

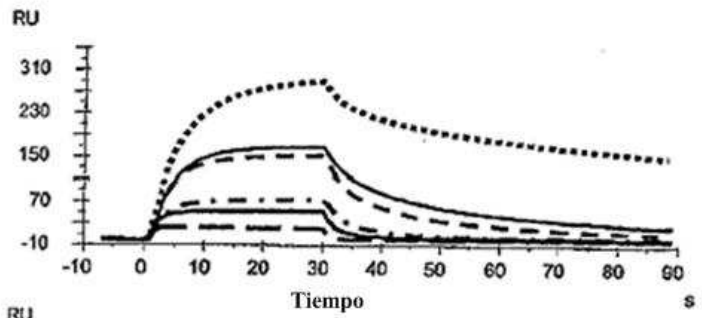
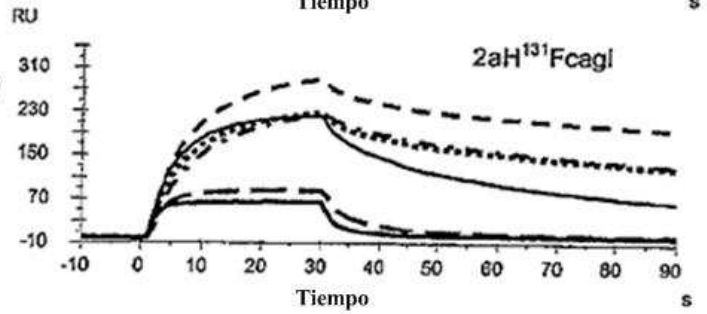


Figura 39D



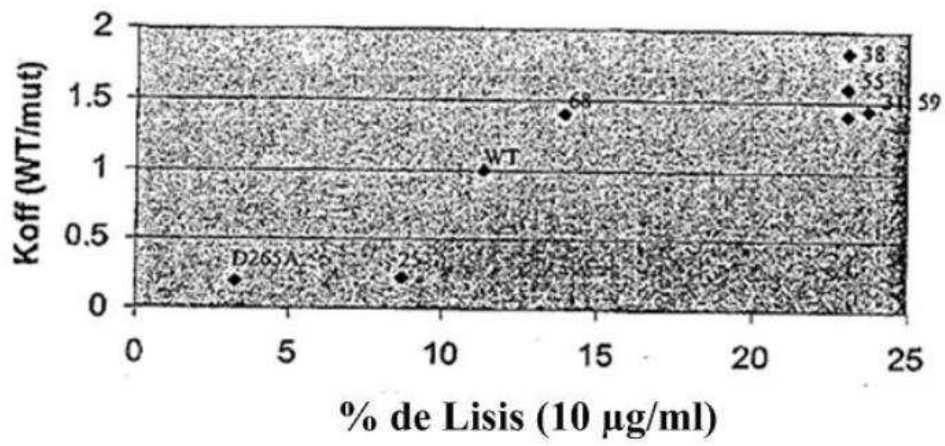


Figura 40

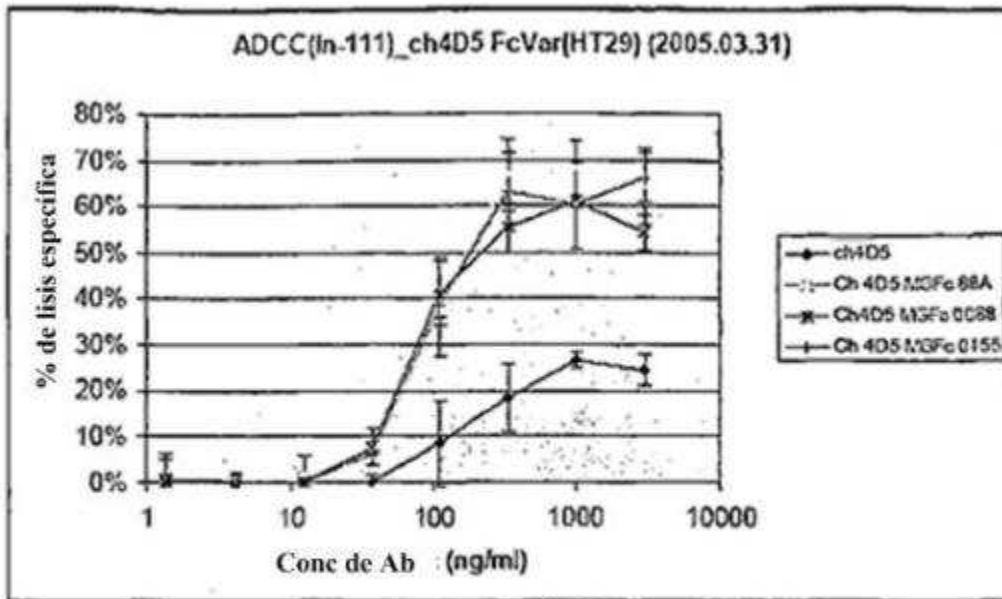


Figura 41A

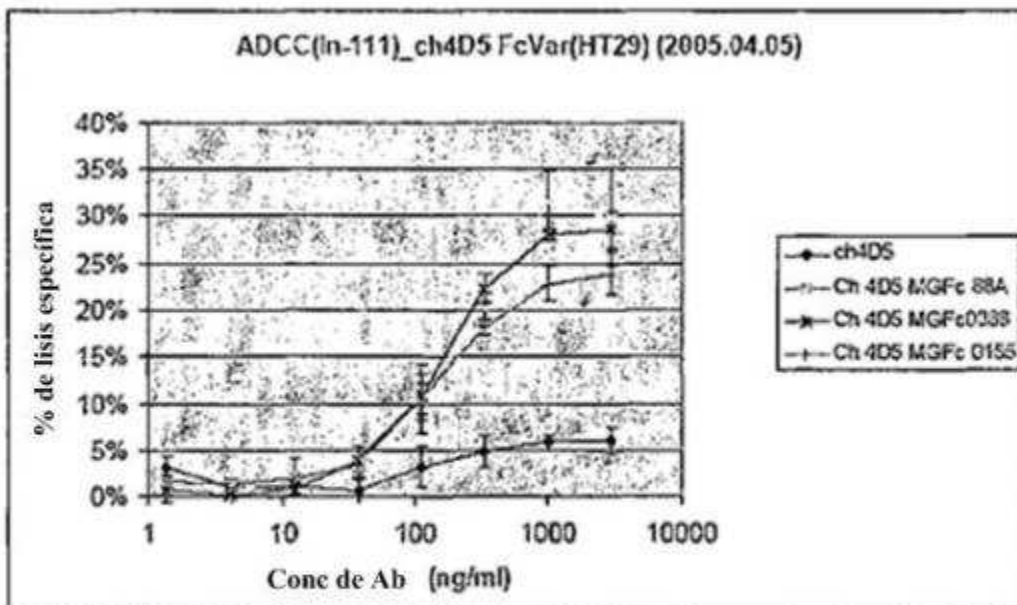


Figura 41B

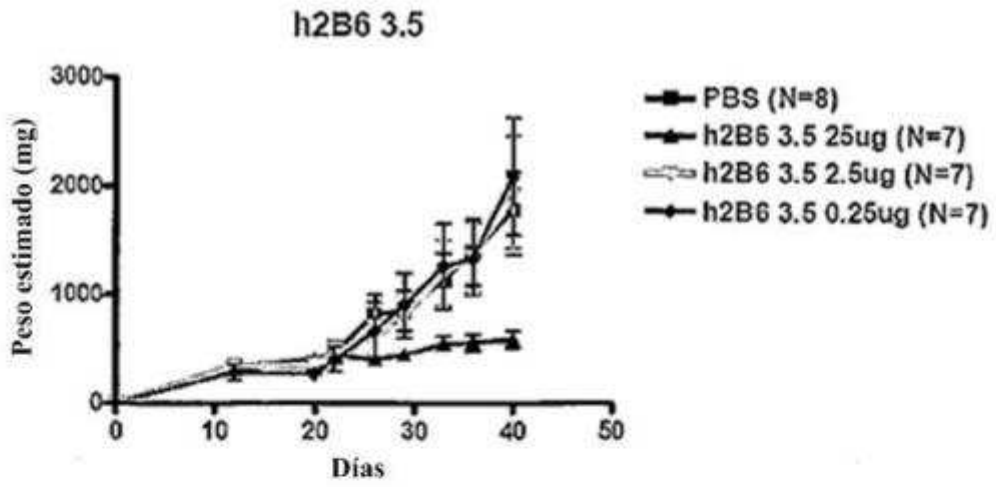


Figura 42A

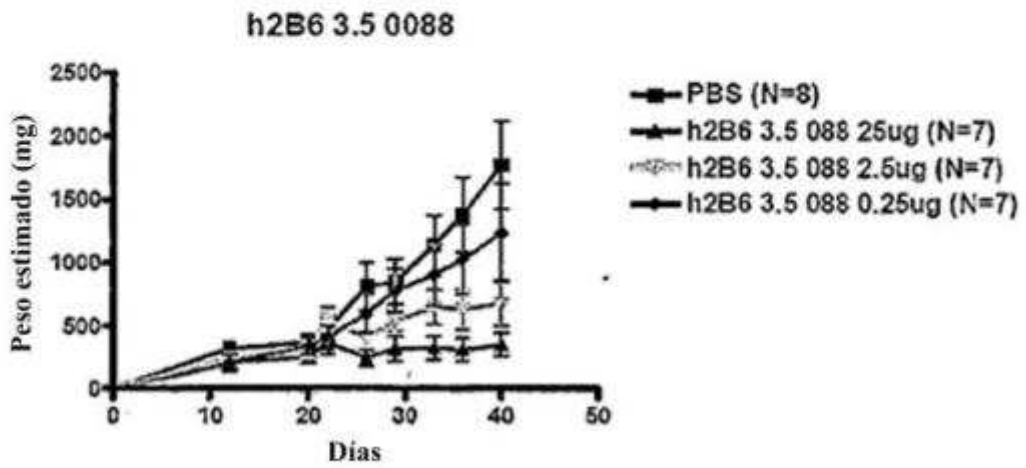


Figura 42B

Proporciones de supervivencia libre de tumor de h2B6 3.5:Supervivencia

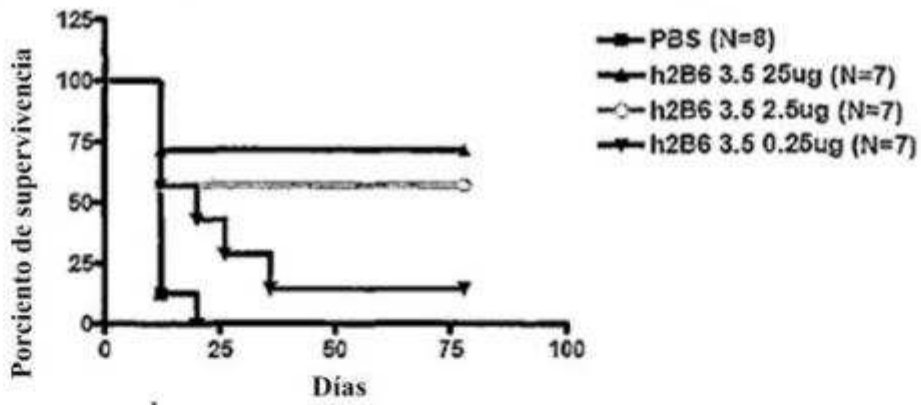


Figura 43A

Proporciones de supervivencia libre de tumor de h2B6 3.5:Supervivencia

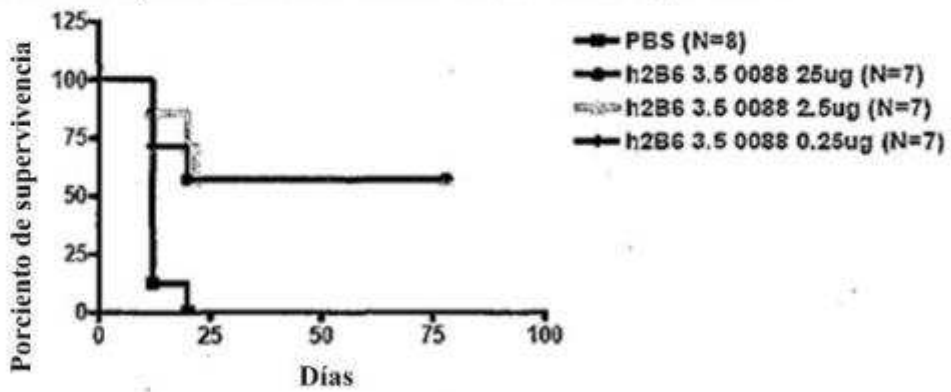


Figura 43B