

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 491**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2005 PCT/US2005/024645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2006 WO06088494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2005 E 05857521 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 1769245**

54 Título: **Identificación e ingeniería de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

28.07.2004 US 902588
12.07.2004 US 587251 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2017

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

RANKIN, CHRISTOPHER;
VIJH, SUJATA;
STAVENHAGEN, JEFFREY;
GORLATOV, SERGEY y
HUANG, LING

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 637 491 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 e ingeniería de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de utilización de los mismos

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a 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 con relación a una región Fc de tipo salvaje, cuya variante de la región Fc se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad, con relación a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje. Las moléculas de la invención son particularmente útiles en la prevención, el tratamiento o la mejora de 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 en el que se desea una eficacia mejorada de la función de las células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por Fc γ R, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa y en potenciar la eficacia de los anticuerpos terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC.

2. Antecedentes de la invención

15 2.1 Fc Receptores y sus funciones en el sistema inmunitario

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

25 Los receptores Fc, miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulina de proteínas, son glicoproteínas superficiales que pueden unirse a la porción Fc de 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 inmunoglobulina. Los receptores Fc para IgG se denominan Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R y para IgA como Fc α R. Diferentes células accesorias llevan receptores Fc para anticuerpos de isotipo diferente, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias se emplearán en una respuesta dada (revisada por Ravetch J.V. et al., 1991, Annu Rev. Immunol., 9: 457-92; Gerber J.S. et al., 2001, Microbes and Infection, 3: 131-139, Billadeau D.D. et al., 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. et al. 2000, Science, 290: 84-89, Ravetch J.V. et al., 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 (adaptada de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4^a edición, 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores Fc γ

35 Cada miembro de esta familia es una glicoproteína de membrana integral, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un dominio de extensión de membrana única y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Existen tres Fc γ R conocidos, designados Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común, tal vez por la duplicación de genes.

Fc γ RII(CD32)

45 Las proteínas Fc γ RII son glicoproteínas de membrana integrales de 40KDa que se unen sólo a la IgG complejada debido a una baja afinidad por la Ig monomérica (10⁶ M⁻¹). Este receptor es el Fc γ R más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. El Fc γ RII tiene sólo dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión de inmunoglobulina y, por lo tanto, una afinidad mucho menor para IgG que Fc γ RI. Existen tres genes Fc γ RII humanos (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C), todos los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunes.

50 Distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de Fc γ RII-A y Fc γ RII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular, tal como fagocitosis y ráfaga respiratoria, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibiendo la activación de células B.

Señalización a través de Fc γ Rs

5 Tanto las señales de activación como las inhibitoras se transducen a través de los Fc γ R después de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmica del receptor denominados motivos de activación basada en tirosina inmunorreceptor (ITAMs) o motivos inhibitorios basados en tirosina inmunorreceptoras (ITIMS) explican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por Fc γ R. Los complejos Fc γ R que contienen ITAM incluyen Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM incluyen solamente Fc γ RIIB.

10 Los neutrófilos humanos expresan el gen Fc γ RIIA. Fc γ RIIA agrupación a través de complejos inmunes o anticuerpos específicos de reticulación sirve para agregar ITAM junto con el receptor asociado quinasas que facilitan ITAM fosforilación. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos aguas abajo (por ejemplo, PI $_3$ K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

15 El gen Fc γ RIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico a Fc γ RIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de Fc γ RIIB define esta subclase inhibitoria de Fc γ R. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coligó junto con un Fc γ R de activación, el ITIM en Fc γ RIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la polifosfato 5'-fosfatasa inositol (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación tirosina quinasa mediada por Fc γ R que contiene ITAM, por lo tanto, la prevención de la afluencia de Ca $^{++}$ intracelular. Por lo tanto, la reticulación de Fc γ RIIB amortigua la respuesta de activación a la ligación Fc γ R e inhibe la capacidad de respuesta celular. La activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos se aborta.

Tabla 1. Receptores para las regiones Fc de los isótopos de inmunoglobulina

Receptor	Fc γ RI (CD64)	Fc γ RII-A (CD32)	Fc γ RII-B2 (CD32)	F γ RII-B1 (CD32)	Fc γ RIII (CD16)	Fc ϵ RI	Fc α RI (CD89)
Unión	IgG1 10 8 M $^{-1}$	IgG1 2 x 10 6 M $^{-1}$	IgG1 2 x 10 6 M $^{-1}$	IgG1 2 x 10 6 M $^{-1}$	IgG1 5 x 10 5 M $^{-1}$	IgE 2 1010 M $^{-1}$	IgA1, IgA2 10 7 M $^{-1}$
Tipo de células	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langheran	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Células B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
Efecto de ligación	Activación de la estimulación de la captación de la inducción de la ráfaga respiratoria de matanza	Liberación de gránulos de captación	Estimulación de la inhibición de la absorción	Inhibición sin captación de la estimulación	Inducción de matanza	Secreción de gránulos	Inducción de captación de la matanza

25 Shields et al. (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 9, pág. 6591-6604, 2001) se describe la cartografía de alta resolución del sitio de unión en IgG1 humana para Fc γ RI humano, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, y receptores FcRn. Se encontró que un conjunto común de residuos de IgG1 estaba implicado en la unión a todos los Fc γ R; Fc γ RII y Fc γ RIII utilizaron residuos fuera de este conjunto común. Además de residuos que, cuando se alteraron, anularon la unión a uno o más de los receptores, se encontraron varios residuos que mejoraban la unión sólo a receptores específicos o mejoraban simultáneamente la unión a un tipo de receptor y reducían la unión a otro tipo.

30 2.2 Enfermedades de relevancia

2.2.1 Cáncer

Una neoplasia, o tumor, es una masa neoplásica que resulta de un 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 "maligno" 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 and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, Págs. 68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y comportarse de manera diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en la que se originan y luego se extienden a otras partes 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 el cáncer sea la principal causa de la muerte en el año 2010. El cáncer de pulmón y próstata son los principales asesinos cáncer para los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y de mama son los principales asesinos cáncer para las mujeres en los Estados Unidos. Uno de cada dos hombres en los Estados Unidos será diagnosticado con cáncer en algún momento de su vida. Una de cada tres mujeres en los Estados Unidos será diagnosticada con cáncer en algún momento de su vida.

Todavía no se ha encontrado una cura para el cáncer. Las opciones de tratamiento actuales, como la cirugía, la quimioterapia y el tratamiento con radiación, son a menudo ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

Terapia del Cáncer

En la actualidad, la terapia contra el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para erradicar células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", in Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Capítulo 12, Sección IV). Recientemente, la terapia de cáncer también podría implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todos estos enfoques plantean inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada 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 sólo es eficaz cuando el tejido neoplásico presenta una mayor sensibilidad a la radiación que el tejido normal, y la radioterapia también puede provocar efectos secundarios graves. La terapia hormonal rara vez se da como un solo agente y aunque puede ser eficaz, se utiliza a menudo para prevenir o retrasar la reaparición del cáncer después de que otros tratamientos han eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias son limitadas en número y pueden producir efectos secundarios tales como erupciones o hinchazón, síntomas similares a los de la gripe, incluyendo fiebre, escalofríos y fatiga, problemas en el tracto digestivo o reacciones alérgicas.

Con respecto a la quimioterapia, hay una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de los agentes quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, ya sea directa o indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótido trifosfato, para evitar la replicación del ADN y la división celular concomitante (véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed. (Pergamom Press, New York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, antimetabolitos, tales como metotrexato e hidroxiaurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campotecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, etc., aunque no necesariamente específicos del ciclo celular, matan células durante la fase S debido a su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente la colchicina y los alcaloides de la vinca, tales como la vinblastina y la vincristina, interfieren con el montaje de los microtúbulos, lo que resulta en un paro mitótico. Los protocolos de quimioterapia generalmente 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", in Scientific American Medicine, volumen 3, Rubenstein and Federman, eds. Capítulo 12, sección 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia causa efectos secundarios importantes, y a menudo peligrosos, incluyendo 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 utilizados en el protocolo de tratamiento a menudo resultan ser resistentes a otros fármacos, incluso a aquellos agentes que actúan por mecanismos distintos de los mecanismos de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina fármaco pleiotrópico o resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, debido a la resistencia a los fármacos, muchos cánceres resultan refractarios a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos contra el cáncer, en particular para el tratamiento del cáncer que ha demostrado ser refractario a los tratamientos estándar contra el cáncer, como la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia hormonal. Una alternativa prometedoras es la inmunoterapia, en la que las

células cancerosas son específicamente dianas de anticuerpos específicos del antígeno del cáncer. Se han dirigido esfuerzos importantes para aprovechar la especificidad de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, la tecnología de hibridomas ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos de tumores (véase Green M.C. et al., 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286, Weiner LM, 1999 Semin Oncol, 26 (supl. 14): 43-51), y en los últimos años, la Food and Drug Administration ha aprobado los primeros MAbs para la terapia del cáncer: Rituxin (anti-CD20) para el linfoma no Hodgkin y Herceptin [anti(c-erb-2/HER-2)] para cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora del anticuerpo, por ejemplo, para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo ("ADCC") es un obstáculo para tal tratamiento. Por lo tanto, se necesitan métodos para mejorar la eficacia de dicha inmunoterapia.

2.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes

La inflamación es un proceso mediante el cual los glóbulos blancos y sustancias químicas del cuerpo protegen nuestro cuerpo de la infección por sustancias extrañas, como bacterias y virus. Por lo general se caracteriza por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento de la zona afectada. Sustancias químicas conocidos como citoquinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada ordenada y autolimitada en la sangre o en los 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, lo que resulta en hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un período limitado en el área relevante, trabajan en beneficio del cuerpo.

En trastornos autoinmunes y/o inflamatorios, el sistema inmune desencadena una respuesta inflamatoria cuando no hay sustancias extrañas para combatir y el sistema inmune normalmente protector del cuerpo causa daño a sus propios tejidos atacándose por error a sí mismo. Hay muchos trastornos autoinmunes diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro está afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con enfermedad de Crohn, y el sinovio, el hueso y el cartilago de diversas articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que los trastornos autoinmunes progresan en la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, puede producirse un crecimiento anormal de un órgano, o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmune puede afectar sólo un órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunes incluyen glóbulos rojos de la sangre, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune del oído interno, miastenia Gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

La artritis reumatoide (AR) y la artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. La artritis es un término general que describe la inflamación en las articulaciones. Algunos tipos de artritis, pero no todos, son el resultado de una 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 de la espondilitis anquilosante y artritis gotosa. La artritis reumatoide es un tipo de artritis crónica que se produce en las articulaciones en ambos lados del cuerpo (como las manos, las muñecas o las rodillas). Esta simetría ayuda a distinguir la artritis reumatoide de otros tipos de artritis. Además de afectar las articulaciones, la artritis reumatoide puede afectar ocasionalmente la piel, los ojos, los pulmones, el corazón, la sangre o los nervios.

La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es potencialmente incapacitante. Hay aproximadamente 2.9 millones de incidencias de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Dos o tres veces más mujeres son afectadas en comparación con hombres. La edad típica en que se presenta la artritis reumatoide es entre 25 y 50 años. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71.000 jóvenes estadounidenses (de dieciocho años o menos), que afecta a seis veces más niñas que niños.

La artritis reumatoide es un trastorno autoinmunitario en el que el sistema inmune del cuerpo identifica incorrectamente las membranas sinoviales que secretan el fluido lubricante en las articulaciones como extrañas. Los resultados de la inflamación, y el cartilago y los tejidos en y alrededor de las articulaciones se dañan o destruyen. En casos severos, esta inflamación se extiende a otros tejidos articulares y cartílagos circundantes, donde puede erosionar o destruir hueso y cartilago y conducir a deformidades articulares. El cuerpo reemplaza el tejido dañado con tejido cicatricial, haciendo que los espacios normales dentro de las articulaciones se estrechen y los huesos se fusionen. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchazón, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre y, a menudo, dolor paralizante. Algunos síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez articular al despertar que dura una hora o más; hinchazón en un dedo específico o articulaciones de la muñeca; hinchazón en el tejido blando alrededor de las articulaciones; e hinchazón en ambos lados de la articulación. La hinchazón puede ocurrir con o sin dolor, y puede empeorar progresivamente o permanecer igual durante años antes de progresar.

El diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, entre ellos: la ubicación específica y la simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez articular en la mañana, la presencia de bultos y nódulos bajo la piel (nódulos reumatoides), los resultados de las pruebas de rayos X que sugieren artritis

reumatoide, y/o resultados positivos de una prueba de sangre llamada factor reumatoide. Muchas, pero no todas, las personas con artritis reumatoide tienen el anticuerpo de factor reumatoide en su sangre. El factor reumatoide puede estar presente en personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades también pueden causar que el factor reumatoide se produzca en la sangre. 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.

El curso típico de la enfermedad es uno de los síntomas de las articulaciones persistentes pero fluctuantes, y después de aproximadamente 10 años, el 90% de los pacientes mostrarán daño estructural al hueso y al cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una enfermedad breve que desaparecerá por completo, y otro pequeño porcentaje tendrá una enfermedad muy grave con muchas deformidades articulares y ocasionalmente otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio provoca erosión o destrucción del hueso y del cartílago en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmune de presentación persistente del antígeno, estimulación de las células T, secreción de citoquinas, activación de las células sinoviales y destrucción de las articulaciones. La enfermedad tiene un gran impacto tanto en el individuo como en la sociedad, causando dolor significativo, deterioro de la función y discapacidad, además de costar millones de dólares en gastos de salud y salarios perdidos. (Ver, por ejemplo, el sitio web del NIH y el sitio web del NIAID).

La terapia actualmente disponible para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis es generalmente antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. "Medicamentos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten sobre estas líneas de tratamiento únicamente. Los recientes avances en la comprensión de la patogénesis de la artritis reumatoide han llevado al uso de metotrexato en combinación con anticuerpos contra citoquinas o receptores solubles recombinantes. Por ejemplo, los receptores solubles recombinantes para el factor de necrosis tumoral (TNF)- α han sido usados en combinación con metotrexato en el tratamiento de la artritis. Sin embargo, sólo aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α tales como receptores solubles recombinantes para TNF- α muestran una mejora clínicamente significativa. Muchos pacientes permanecen refractarios a pesar del tratamiento. Todavía persisten problemas de tratamiento para los pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden prevenir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, ningún tratamiento es ideal, y no hay cura. Se necesitan terapias nuevas que traten más eficazmente la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunes.

2.2.3 Enfermedades infecciosas

Los agentes infecciosos que causan enfermedades se dividen en cinco grupos: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (gusanos). La notable variedad de estos patógenos ha causado la selección natural de dos características cruciales de la inmunidad adaptativa. En primer lugar, la ventaja de ser capaz de reconocer una amplia gama de patógenos diferentes ha impulsado el desarrollo de receptores sobre células B y T de diversidad igual o mayor. En segundo lugar, los distintos hábitats y ciclos de vida de los patógenos tienen que ser contrarrestados por una serie de mecanismos efectores distintos. Los rasgos característicos de cada patógeno son su modo de transmisión, su mecanismo de replicación, su patogenicidad o los medios por los que causa la enfermedad, y la respuesta que provoca.

El registro del sufrimiento y la muerte de humanos causados por la viruela, el cólera, el tifus, la disentería, la malaria, etc., establece la eminencia de las enfermedades infecciosas. A pesar de los éxitos sobresalientes en el control proporcionado por el saneamiento mejorado, la inmunización y la terapia antimicrobiana, las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema común e importante de la medicina moderna. La enfermedad más común de la humanidad, el resfriado común, es una enfermedad infecciosa, como es la temida enfermedad moderna del SIDA. Algunas enfermedades neurológicas crónicas que antes se consideraban enfermedades degenerativas han demostrado ser infecciosas. No hay duda de que el futuro seguirá revelando las enfermedades infecciosas como problemas médicos importantes.

Un número enorme de enfermedades humanas y animales resultan de infecciones virulentas y oportunistas de cualquiera de los agentes infecciosos mencionados anteriormente (véase Belshe (Ed.) 1984 Textbook of Human Virology, PSG Publishing, Littleton, MA).

Una categoría de enfermedades infecciosas son infecciones virales, por ejemplo. Las enfermedades virales de una amplia gama de tejidos, incluyendo el tracto respiratorio, el SNC, la piel, el tracto genitourinario, los ojos, las orejas, el sistema inmunitario, el tracto gastrointestinal y el sistema musculoesquelético, afectan a un gran número de humanos de todas las edades (véase Tabla 328-2 en: Wyngaarden and Smith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18ª Ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pp. 1750-1753). Aunque se han invertido considerables esfuerzos en el diseño de terapias antivirales eficaces, las infecciones virales continúan amenazando la vida de millones de personas en todo el mundo. En general, los intentos de desarrollar fármacos antivirales se han centrado en varias etapas del ciclo vital viral (véase, por ejemplo, Mitsuya et al., 1991, FASEB J. 5: 2369-2381, que discuten el VIH). Sin embargo, un inconveniente común asociado con el uso de muchos fármacos antivirales actuales son sus efectos secundarios deletéreos, tales como toxicidad para el huésped o resistencia de ciertas cepas virales.

3. Resumen de la invención

La invención proporciona un polipéptido que tiene una región Fc de IgG1 humana variante en la que dicha región Fc variante:

(A) contiene un dominio CH2 y un dominio CH3;

- 5 (B) posee una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de una región Fc de tipo salvaje por comprender modificaciones de aminoácidos seleccionadas relativas a dicha región Fc de tipo salvaje, en donde dichas modificaciones de aminoácidos seleccionadas comprenden R292P y V305I,

10 en el que dicha numeración es la del índice de la UE como en Kabat y donde dichas sustituciones de aminoácidos seleccionadas hacen que dicha región Fc variante se una a Fc γ R111A con una afinidad incrementada con respecto a la de dicha región Fc de tipo salvaje.

15 La presente invención se basa, en parte, en la identificación de regiones Fc de cadena pesada de IgG1 humana mutante, con afinidades alteradas para receptores Fc γ R (por ejemplo, Fc γ Rs de activación, Fc γ Rs inhibidores), utilizando un sistema de despliegue en levaduras. El modelado animal *in vivo* y los experimentos clínicos indican que la región Fc desempeña un papel esencial en la determinación del resultado de la terapia con anticuerpos monoclonales. Los enfoques actuales para optimizar la función de la región Fc (por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), actividad citotóxica dependiente del complemento (CDC)) en anticuerpos monoclonales terapéuticos y polipéptidos solubles fusionados a regiones Fc se han centrado en un número limitado de cambios de aminoácidos individuales basados en el análisis estructural y/o diseños asistidos por computadora. Los enfoques alternativos en las regiones Fc de ingeniería se han centrado en la glicosilación de la región Fc para optimizar la función de la región Fc. La presente invención se basa, en parte, en la selección de posibles mutantes para la alteración en una o más actividades funcionales de Fc, tales como, pero sin limitarse a, ADCC y CDC, a partir de una biblioteca no sesgada de variantes de Fc. La presente invención proporciona métodos para la ingeniería de regiones Fc y la identificación y selección de nuevas variantes Fc fuera de las regiones esperadas identificadas mediante estudios estructurales. Las regiones esperadas, tal como se usan aquí, se refieren a aquellas regiones que están basadas en estudios estructurales y/o bioquímicos están en contacto con un ligando Fc.

25 La presente descripción proporciona una plataforma de descubrimiento para la identificación de variantes de Fc con mejoras en una o más funciones efectoras Fc combinando ensayos funcionales basados en células y construcción de biblioteca combinatoria con automatización de vanguardia. La presente descripción reúne bibliotecas combinatorias completas saturando regiones de interés dentro de la Fc con modificaciones que cubren todos los posibles cambios de aminoácidos. Las bibliotecas combinatorias se probarán utilizando un conjunto de ensayos de unión y funcionales para seleccionar mutantes basados en una función biológica mejorada.

35 En consecuencia, la invención se refiere a moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc de IgG1 humana variante, que tiene modificaciones de aminoácidos incluyendo las definidas en la reivindicación 1 (por ejemplo sustituciones, inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, modificaciones que alteran, por ejemplo, el aumento o la disminución, la afinidad de la región Fc de la variante para un Fc γ R. La modificación de aminoácidos incrementa la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. En una realización preferida, las moléculas de la invención se unen específicamente a Fc γ R11B (a través de la región Fc) con una afinidad más baja que una molécula comparable (es decir, que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de la invención con excepción de una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc) que comprenden la región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ R11B. En algunas realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A y mejoran la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R11B en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, la invención engloba moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A pero no alteran la afinidad de la variante Fc para Fc γ R11B con relación a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. Una realización preferida es una región Fc variante que tiene afinidad mejorada para Fc γ R111A y Fc γ R11A pero afinidad reducida para Fc γ R11B con relación a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje.

50 Las variantes de Fc de la presente invención se pueden combinar con otras modificaciones de Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar una variante de Fc de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o nuevas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferiblemente, las variantes Fc de la invención mejoran el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante Fc de la invención se combina con un mutante conocido para unirse a Fc γ R111A con una afinidad más alta que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje; la combinación con un mutante de la invención da como resultado un mayor aumento del plegamiento en la afinidad con Fc γ R111A.

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

La invención abarca moléculas que son homodímeros o heterodímeros de regiones Fc. Los heterodímeros que comprenden regiones Fc se refieren a moléculas en las que 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 de la otra cadena. En otras realizaciones, en las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, una cadena contiene la región Fc de tipo salvaje y las otras cadenas comprenden una o más modificaciones. Los métodos de ingeniería de moléculas heterodiméricas que contienen Fc se conocen en la técnica y se incluyen dentro de la invención.

En una realización específica, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante sólo se une a un Fc γ R, en el que dicho Fc γ R es Fc γ IIIA.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un Fc γ R se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o basados en inmunología) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-Fc γ R, es decir, la unión específica de un Fc región a un Fc γ R incluyendo pero sin limitarse a un ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 5.2.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan también por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de Fc γ R (véase la sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados aquí) como aquellos en ensayos basados en *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiban el fenotipo deseado en ensayos basados en *in vitro*, pero sí muestran el fenotipo deseado *in vivo*.

En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA al menos 2 veces, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA mayor que 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces, o al menos 10 veces con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones de la invención, las moléculas de la invención que comprenden una región Fc variante se unen específicamente a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con al menos 65%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200% mayor afinidad con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo salvaje. Dichas mediciones son preferiblemente ensayos *in vitro*.

En aun otras realizaciones, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, modificaciones que disminuyen la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, pero no alteran la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIB relativa a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones más, la invención abarca moléculas con regiones Fc variantes, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, pero reducen la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIB con relación a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje.

En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que incrementan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y disminuyen la afinidad de la variante Fc para Fc γ RIIB, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB con afinidad de tipo salvaje. En una cierta realización, una o más modificaciones de aminoácidos no son una sustitución con alanina en ninguna de las posiciones 256, 298, 333 o 334.

En otra realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que incrementan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIA y disminuyen la afinidad de la variante Fc para Fc γ RIIB, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ RIIA y Fc γ RIIB con afinidad de tipo salvaje. En una cierta realización, una o más modificaciones de aminoácidos no son una sustitución con arginina en la posición 320.

El método preferido para cribar e identificar moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas de Fc γ R (por ejemplo afinidad Fc γ R111A mejorada) es la tecnología de presentación en superficie de levadura (para revisión véase Boder and Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444. Específicamente, despliegue en superficie de levadura es un método genético mediante el cual los polipéptidos que comprenden mutantes Fc se expresan en la pared celular de levadura en una forma accesible para interactuar con Fc γ R. La visualización de la superficie de levadura de los polipéptidos que contienen Fc mutante de la invención se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica o los métodos específicos descritos en el presente documento. El despliegue en levaduras ofrece la ventaja de utilizar la unión real a un receptor deseado para identificar regiones Fc variantes que tienen una unión mejorada a ese receptor.

Se describe aquí un método para seleccionar proteínas de fusión mutantes Fc con una propiedad de unión deseable, por ejemplo, la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a Fc γ R111A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A. Las células de levadura que muestran las proteínas de fusión de Fc mutantes pueden ser seleccionadas y caracterizadas por cualquier ensayo bioquímico o inmunológico basado en el conocimiento de los expertos en la técnica para evaluar las interacciones de unión.

El cribado de proteínas de fusión de Fc mutante puede hacerse usando uno o más ensayos basados en bioquímicos, por ejemplo, un ensayo ELISA.

El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas de Fc γ R (por ejemplo, afinidad de Fc γ R111A mejorada) se pueden hacer usando la tecnología de despliegue en levaduras como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímicos, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-Fc γ R, es decir, unión específica de una región Fc a un Fc γ R, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y diálisis de equilibrio. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas de Fc γ R (por ejemplo, afinidad de Fc γ R111A mejorada) se pueden hacer usando la tecnología de despliegue en levaduras como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los ensayos basados funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R tales como las descritas en la presente en la sección 5.2.6. Ejemplos no limitativos de funciones de células efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a células, demarcación, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades de Fc γ R alteradas (por ejemplo, afinidad de Fc γ R111A mejorada) se pueden hacer usando la tecnología de presentación de levadura como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica en combinación o en paralelo con uno o más ensayos basados funcionales, preferiblemente de una manera de alto rendimiento.

Un método preferido para medir 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 para su ligando, por ejemplo, en el micromolar para Fc γ R11B y Fc γ R111A. El método implica la formación de un complejo Fc γ R (por ejemplo, Fc γ R111A, Fc γ R11B) 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 producir un complejo Fc γ R tetramérico, en el que dicho complejo tetramérico tiene una afinidad mejorada para una región Fc, con relación a la afinidad de un Fc γ R monómero para la región Fc, comprendiendo dicho método: (i) producir una proteína de fusión, de manera que una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos enlazada operativamente a la región soluble de Fc γ R; (ii) biotilación de la proteína producida usando una enzima BirA de *E. coli*; (iii) mezclar la proteína biotilada producida con estreptavidina-ficoeritrina en una proporción molar apropiada, de manera que se forme un complejo de Fc γ R tetramérico.

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

Se describe el uso de los complejos inmunitarios 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 sin células.

En una realización específica, la invención proporciona inmunoglobulinas modificadas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. Dichas inmunoglobulinas incluyen moléculas de

IgG que contienen naturalmente regiones de unión a Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIB) o derivados de inmunoglobulina que han sido modificados genéticamente para contener una región de unión Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIB). Las inmunoglobulinas modificadas de la invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferiblemente, inmuno-específicamente, es decir, compete contra la unión no específica determinada por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar un antígeno antígeno-anticuerpo específico y contiene un Fc γ R (por ejemplo, una región de unión a Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIB). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multispecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos a disulfuro y fragmentos que contienen un dominio VL o VH o incluso una región determinante complementaria (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, modificado genéticamente para contener o fusionarse a una región de unión a Fc γ R.

En ciertas realizaciones, la invención abarca inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y / o Fc γ R1IIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora aumentada, 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 el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA tienen una actividad de ADCC mejorada con respecto al tipo salvaje en 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 la ingeniería de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc por modificación de residuos de aminoácidos, modificaciones que modulan la afinidad del anticuerpo terapéutico para un receptor activador de Fc γ R y/o un anticuerpo Fc γ R receptor inhibitor. En una realización, la invención se refiere a la ingeniería de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc por modificación de residuos de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA. En otra realización, la invención se refiere a la ingeniería de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc mediante la modificación de residuos de aminoácidos, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA y disminuye adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc γ R1IIB. Los anticuerpos terapéuticos manipulados pueden tener adicionalmente una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad de ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., según se determina mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, el anticuerpo humanizado Ab4D5 como se describe en Carter et al., 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 4285-9) mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de residuos de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal humanizado Her2/neu también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc γ R1IIB. En aún otra realización específica, los anticuerpos monoclonales humanizados modificados genéticamente específicos para Her2/neu pueden tener adicionalmente una función efectora mejorada determinada por ensayos convencionales conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados aquí.

En otra realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano de ratón, 2H7 por modificación de residuos de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado, 2H7 pueden tener además una función efectora mejorada determinada por los ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

En otra realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo anti-Fc γ R1IIB que incluye pero no se limita a cualquiera de los anticuerpos descritos en la Solicitud de los Estados Unidos No. 10/643.857 presentada el 14 de Agosto de 2003, que tiene el Expediente de Apoderado No. 011183 -010-999, por modificación de residuos de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA. Ejemplos de anticuerpos anti-Fc γ R1IIB que pueden ser manipulados de acuerdo con los métodos de la invención son anticuerpos monoclonales 2B6 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4591 y 3H7 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4592 (depositado en ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-Fc γ R1IIB también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc para Fc γ R1IIB. En otra realización específica, el anticuerpo anti-Fc γ R1IIB modificado genéticamente puede tener además una función efectora mejorada determinada por los ensayos convencionales conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican una molécula de la invención, incluyendo polipéptidos y anticuerpos, identificados mediante los métodos de la presente invención.

Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede ser determinada, por cualquier método conocido en la técnica. La invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de la invención. La invención también proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico. La invención proporciona además células huésped que contienen los vectores o polinucleótidos de la invención.

Se describen métodos para la producción de las moléculas de la invención. Las moléculas de la invención, incluyendo polipéptidos y anticuerpos, se pueden producir por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, en particular, por expresión recombinante. En una realización específica, la invención se refiere a un método para producir de manera recombinante una molécula de la invención, comprendiendo dicho método: (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) recuperación de dicha molécula de dicho medio.

Las moléculas identificadas de acuerdo con los métodos 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 en el que se desea una eficacia mejorada de la función de las células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por Fc γ R, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa y en el aumento de la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC.

En una realización, la invención abarca las moléculas de la invención para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une al antígeno de cáncer, que ha sido fabricado de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización específica, la invención abarca las moléculas de la invención para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer, que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje como se define en la reivindicación 1, de tal manera que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a Fc γ R11A con una mayor afinidad que el anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R11A. La invención abarca moléculas de la invención para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente caracterizado por un antígeno de cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz o un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer y dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante de modo que el anticuerpo tiene una actividad ADCC mejorada.

También se describe un método para tratar un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende una región Fc variante, donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos relativa a una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicha molécula se une específicamente a Fc γ R11B con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje y dicha molécula se une específicamente a Fc γ R11A con una afinidad menor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje, y dicha molécula se une a un complejo inmune (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo). La invención abarca un método para tratar un trastorno autoinmune y/o un trastorno inflamatorio que comprende además la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, utilizados para el tratamiento y/o prevención de tales enfermedades.

También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que se unen a un agente infeccioso o receptor celular de la misma. Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o evitadas por las moléculas de la invención son causadas por agentes infecciosos que incluyen pero no se limitan 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 anticuerpos mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En una realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa aumentando la fagocitosis y/o la 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 aumentando el ADCC de las células infectadas que causan la enfermedad infecciosa.

En algunos casos, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. La invención contempla moléculas de la invención en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para su uso en el tratamiento y/o 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 diseñado de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero no limitando, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores.

3.1 Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define para estirarse de Cys226 al extremo carboxi. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde los aminoácidos 231 al aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde los aminoácidos 342 a 447. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "Cy2") se extiende normalmente desde el aminoácido 231-340. El dominio CH2 es único en que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificados unidos 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 la del índice de la UE como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El "índice de la UE como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo IgG1 EU humano.

La "región bisagra" se define generalmente como estiramiento de Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando los residuos de cisteína primero y último formando enlaces S-S de cadena intermedia-pesada en las mismas posiciones.

Como se usan aquí, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-Id para anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al 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.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada por la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado", como se usa en el presente documento, también se refiere a un polipéptido o proteína que ha sido modificado, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede modificarse un anticuerpo, por ejemplo por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Un polipéptido o proteína derivada puede producirse mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, 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 cual se derivó.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma sobre la base de la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero no se limita a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede estar esterificada, alquilada y/o fosforilada.

Como se usa en este documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para referirse a una condición en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmune" se usa indistintamente con el término "trastorno autoinmune" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por lesión celular, de tejido y/u órgano causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden o no estar asociados con la inflamación. Además, la inflamación puede o no ser causada por un trastorno autoinmune. Por lo tanto, ciertos trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunes como inflamatorios.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a un neoplasma o tumor que resulta de un crecimiento anormal no controlado de las células. Como se usa aquí, el cáncer incluye explícitamente, leucemias

y linfomas. En algunas realizaciones, el 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 las estructuras del cuerpo vecino y se ha diseminado a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con un antígeno de cáncer específico.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "agente inmunomodulador" y sus variaciones se refieren a un agente que modula el sistema inmune de un huésped. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En ciertas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

10 Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une inmuno específicamente un anticuerpo según se determina por cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no tienen necesariamente que ser inmunogénicos.

15 Tal como se usa en el presente documento, 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 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 amino contiguos, al menos 70 restos de 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
20 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función del polipéptido.

25 Como se usan aquí, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, inosina o bases tritiladas. Tales análogos pueden comprender también moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas dorsales modificadas que dan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada de cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de cadena sencilla, de doble cadena, pueden contener tanto porciones de cadena sencilla como de doble
30 cadena, y pueden contener porciones de triple cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

35 Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar el inicio de la enfermedad, por ejemplo, retardar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad.

40 Tal como se usa en el presente documento, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente o agentes que se pueden usar en la prevención de un trastorno o prevención de la reaparición o diseminación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o propagación de una enfermedad hiperproliferativa, en particular el cáncer, o la aparición de la misma en un paciente, incluyendo pero no limitándose a aquellos predispuestos a enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo aquellos genéticamente predispuestos al cáncer o previamente expuesto a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse 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 esa cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de
45 la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Tal como se utiliza aquí, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o

terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administran agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Se puede administrar un primer agente profiláctico o terapéutico antes (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), concomitantemente con, o posterior 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, o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

"Función efectora", como se usa en el presente documento, significa un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto las que operan después de la unión de un antígeno como las que operan independientemente de la unión al antígeno.

"Célula efectora", como se usa en el presente documento, significa una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero no se limitan a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y pueden ser de cualquier organismo incluyendo pero no limitado a humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

El término "ligando Fc" tal como se utiliza en el presente documento, significa una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo ligando Fc. Fc incluyen pero no se limitan a Fc γ Rs, Fc γ Rs, Fc γ Rs, FcRn, C1q, C3, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y Fc γ R vírico. Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Análisis SDS-PAGE de Fc γ R recombinante soluble

La pureza de las proteínas Fc γ R solubles recombinantes se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Carril 1: Fc γ RIIIA soluble recombinante purificado; Carril 2: marcador de peso molecular; Carril 3: marcador de peso molecular; Carril 4: Fc γ RIIB soluble recombinante purificado. Los guiones se refieren al peso molecular de los marcadores, de arriba hacia abajo, que corresponden a un peso molecular de 98, 50, 36 y 22 KDa, respectivamente.

Figura 2 Ensayo ELISA de Fc γ R recombinante soluble

La unión directa de Fc γ RIIIA soluble recombinante purificado a IgG agregada y monomérica se determinó usando un ensayo ELISA. La unión de IgG (\blacktriangle) agregada con 3G8; (\blacklozenge) IgG biotinilada; (\blacksquare) IgG agregada; (X) IgG agregada con IgG1 de ratón.

Figuras 3 A y B Caracterización del complejo tetramérico Fc γ RIIIA usando un ensayo ELISA

A. El complejo tetramérico Fc γ RIIIA soluble se une específicamente a las IgG humanas monoméricas solubles. La unión de Fc γ RIIIA tetramérica soluble a IgG humana es bloqueada por 3G8 (\blacklozenge), un anticuerpo monoclonal anti-Fc γ RIIIA de ratón; el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que albergaba la mutación D265A no fue capaz de bloquear la unión de Fc γ RIIIA tetramérico soluble a IgG humana agregada (Δ).

B. La unión del complejo tetramérico soluble Fc γ RIIIA a IgG humana monomérica soluble (\blacksquare) se compara con la unión de Fc γ RIIIA soluble monomérico a IgG humana monomérica soluble (\blacklozenge).

Figuras 4 A y B Caracterización del complejo tetramérico Fc γ RIIIA utilizando un ensayo de perlas magnéticas

A. Complejo Fc γ RIIIA: dos Fc γ RIIIA (forma rellena) están unidos por un anticuerpo monoclonal DJ130c (1^{er} Ab); el F(ab)₂ antiratón se conjuga con PE (círculo).

B. Análisis FACS de Fc γ RIIIA unido a perlas recubiertas de Fc: (a) perlas solas; (b) complejos sin Fc γ RIIIA; (c) complejo con Fc γ RIIIA; (d) complejo con Fc γ RIIIA y LNK16.

Figura 5 Presentación esquemática de Fc que contiene constructos

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

Figuras 6A-H Análisis FACS de las proteínas de fusión Fc en la pared celular de levaduras

Las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humano conjugado con PE (Figuras 6A-D) o con HP6017 (Sigma), un anticuerpo monoclonal específico Fc (CH3) anti-IgG1 humano de ratón (Figuras 6E-H). A y E representan vector solo; los paneles B y F representan la construcción CH1-CH3; los paneles C y G representan el GIF227; y los paneles D y H representan el constructo GIF 206.

Figuras 7A-C Unión de Fc γ R1IIIA tetramérica soluble a las proteínas de fusión Fc visualizadas en superficie

Células que contienen pYD1-CH1 (A); pYD-CH1-265A (B); y el vector pYD (C) en condiciones para expresar proteínas de fusión Aga2p en la superficie celular. Las células se incubaron con Fc γ R1IIIA a 0.15 mM, 7.5 mM y 7.5 mM, respectivamente, y se analizaron mediante FACS.

Figura 8 Caracterización de la unión de Fc γ R1IIIA tetramérica soluble a las proteínas de fusión Fc visualizadas en superficie

Se analizó la unión del complejo tetramero Fc γ R1IIIA a las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura. Se preincubaron complejos de Fc γ R1IIIA tetramérica PE-conjugados con diferentes concentraciones de 3G8 (♦), LNK (▲) o un control de isotipo irrelevante (■), y posteriormente se incubaron con las células de levadura. Las células fueron analizadas por FACS en cuanto a la fluorescencia de PE. El porcentaje de células que unieron el complejo tetramero de Fc γ R1IIIA se representaron en el eje y.

Figura 9 Ejemplo de portal de clasificación para seleccionar mutantes Fc con una unión aumentada a Fc γ R1IIIA

Las células se tiñeron con complejos tetraméricos Fc γ R1IIIA conjugados con PE (eje y) y anticuerpo conjugado con Fc-FITC (eje x). El área en caja representa el portal de clasificación establecida para seleccionar ~1.0 % de la población de células.

Figuras 10A-N Análisis FACS de algunos de los mutantes Fc identificados que tienen una afinidad aumentada para los complejos tetraméricos Fc γ R1IIIA

Los clones individuales que albergaban el plásmido pYD-CH1 que contenía mutaciones Fc independientes se amplificaron en medios selectivos que contenían glucosa, fueron inducidos para la expresión de Fc en medio selectivo que contenía galactosa y posteriormente analizados por FAC. Las Figuras 10A y B representan células que albergan Fc de tipo salvaje; las Figuras 10C y D representan el mutante # 5; las Figuras 10E y F representan el mutante # 20; las Figuras 10G y H representan el mutante # 21; las Figuras 10 I y J representan el mutante # 24; las Figuras 10K y L representan el mutante # 25; las Figuras. 10M y N representan el mutante # 27. Las células se tiñeron con el complejo tetramérico Fc γ R1IIIA (Figuras 10A, C, E, G, I, K y M) o el complejo tetramero Fc γ R1IIB (Figuras 10B, D, F, H, J, L, y N).

Figuras 11 A-B Caracterización de los mutantes Fc en el anticuerpo monoclonal 4-4-20 por ELISA

Los dominios Fc de los plásmidos pYD-CH1 se clonaron en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal quimérico 4-4-20. El anticuerpo monoclonal 4-4-20 se expresó en células 293 y se recogieron los sobrenadantes. Las placas de ELISA se recubrieron con BSA conjugado con fluoresceína para capturar los anticuerpos quiméricos 4-4-20 mutantes. Los receptores Fc γ R1IIIA (A) y Fc γ R1IIB (B) se recubrieron luego sobre las placas ELISA a las que se habían absorbido los anticuerpos monoclonales 4-4-20 con el fin de determinar las afinidades relativas de los receptores variantes a los dominios Fc. Los mutantes # 15 y # 29 fueron aislamientos no enlazantes incluidos como controles.

Figura 12 Actividad ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal 4-4-20

Anticuerpos 4-4-20 que contienen las regiones mutantes Fc fueron evaluados para su actividad ADCC, y en comparación con la actividad de ADCC de un tipo salvaje 4-4-20 anticuerpos. 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 suprimido), MGFc-34 (F241L, E258G), MGFc-35 (R255Q, K326E), MGFc-36 (K218R, G281D, G385R).

Figuras 13 A y B Actividad ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado

A. Los anticuerpos monoclonales HER2/neu humanizados que contenían regiones Fc mutantes se evaluaron para su actividad ADCC y se compararon con la actividad ADCC de un anticuerpo Her2/neu de tipo salvaje. 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).

B. Actividad ADCC de mutantes adicionales en el contexto del anticuerpo monoclonal humanizado Her2/neu 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.

Figura 14 Captura del anticuerpo CH 4-4-20 en la superficie BSA-FITC

5 Se inyectaron 6 μ l de anticuerpo a una concentración de aproximadamente 20 μ g/ml a 5 μ l/min sobre una superficie de isotiocianato de BSA-fluoresceína (FITC). Se muestra el sensograma BIAcore de la unión de anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes en la superficie del buque sensor BSA-FITC inmovilizado. El marcador se ajustó en la respuesta de anticuerpos capturados de tipo salvaje.

Figura 15 Sensograma de unión en tiempo real de Fc γ RIIIA A CH 4-4-20 anticuerpos que llevan regiones Fc variantes

10 La unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que llevaban regiones Fc variantes se analizó a una concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo salvaje.

Los mutantes utilizados 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 16 A-H Análisis de parámetros cinéticos de Fc γ RIIIA que se une a anticuerpos que transportan regiones Fc variantes

15 Los parámetros cinéticos para la unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos que llevan regiones Fc variantes se obtuvieron generando curvas de mejor ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo basado en los valores de k_{apagado} calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 seg. Los valores de K_d y k_{apagado} representan el promedio de dos concentraciones.

20 Figura 17 Sensograma de unión en tiempo real de proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos que transportan regiones Fc variantes

La unión de proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que llevaban regiones Fc variantes se analizó a una concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo salvaje.

25 Figuras. 18 A-C Análisis de los parámetros cinéticos Fc γ RIIB-Fc proteínas de fusión a anticuerpos que transportan regiones Fc variantes

Se obtuvieron parámetros cinéticos para la unión de Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos que llevaban regiones Fc variantes generando curvas de mejor ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo basándose en los valores de k_{apagado} calculados para las curvas de disociación en los 32-34 segundos de intervalo. Los valores de K_d y k_{apagado} representan el promedio de dos concentraciones.

30 Los mutantes utilizados 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).

Figura 19 Relaciones de $K_{\text{apagado}}(\text{WT})/K_{\text{apagado}}(\text{MUT})$ para Fc γ RIIIA-Fc representadas contra datos ADCC

35 Los números superiores a uno muestran una tasa de disociación disminuida para la unión de Fc γ RIIIA y una tasa de disociación incrementada para la unión de Fc γ RIIB-Fc con relación al tipo salvaje. Los mutantes en la caja tienen una tasa de descenso más baja para la unión a Fc γ RIIIA y una tasa de liberación más alta para la unión a Fc γ RIIB-Fc.

Figura 20 Competición con Fc γ RIIIA no marcado

40 Se implementó una criba cinética para identificar mutantes de región Fc con velocidades de K_{apagado} mejoradas para unirse a Fc γ RIIIA. Se incubó una biblioteca de variantes de la región Fc que contenía la mutación P396L con 0.1 μ M de Fc γ RIIIA-Linker-Avitag biotinilado durante una hora y después se lavó. Posteriormente se incubó Fc γ RIIIA 0.8 μ M sin marcar con la levadura marcada para diferentes puntos de tiempo. La levadura se centrifugó y se separó el Fc γ RIIIA sin marcar, se tiñó la levadura unida al receptor con SA(estreptavidina):PE(ficoeritrina) para análisis FACS.

Figuras. 21 A-C Análisis FACS basado en la criba cinética

45 Basándose en el K_{apagado} calculado a partir de los datos presentados en la Figura 20, se eligió una selección de un punto de tiempo de un minuto. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca con monómero Fc γ RIIIA-Linker-Avitag biotinilado 0.1 μ M; las células se lavaron e incubaron con ligando no marcado durante un minuto; después se lavó y se marcó con SA:PE. Las células se clasificaron a continuación mediante FACS, seleccionando los aglutinantes superiores al 0.3%. La biblioteca de P396L no sintetizada se comparó con las células de levadura seleccionadas para una unión mejorada por FACS. Los histogramas muestran el porcentaje de células que se cubren tanto con Fc γ RIIIA/PE como con Fc/FITC antihumano de cabra.

50

Figuras 22 A-B Selección basada en la aplicación de fases sólidas de enlazantes Fc γ R1IB Fc

- 5 A. La biblioteca P396L se seleccionó basándose en la disminución de Fc γ R1IB y en la selección de Fc γ R1IIIA usando perlas magnéticas. La disminución de Fc γ R1IB por perlas magnéticas se repitió 5 veces. Se analizó la población de levadura resultante y se encontró que mostraba una tinción celular mayor que el 50% con Fc antihumano de cabra y un porcentaje muy pequeño de células teñidas con Fc γ R1IIIA. Posteriormente, las células fueron seleccionadas dos veces por FACS utilizando 0.1 μ M biotinilado Fc γ R1IIIA Linker-Avitag. Las células de levadura se analizaron tanto para Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IB enlazante después de cada tipo y en comparación con el tipo salvaje enlazante.
- 10 B. Los mutantes Fc se seleccionaron de la población de levadura empobrecida Fc γ R1IB usando monómero Avitag Fc γ R1IIIA 158F biotinilado como ligando. El portal de clasificación se ajustó para seleccionar los aglutinantes de 0.25% de Fc γ R1IIIA 158F superiores. La población enriquecida resultante se analizó por FACS para la unión a los diferentes Fc γ R1IIIA (158F y 158V), Fc γ R1IIB y Fc γ R1IIA (131R).

Figura 23 Ratas relativas de la lisis de células diana SKBR3 mediada por mutantes FC de 4D5 quimérico

- 15 Las ratas relativas de lisis se calcularon para cada mutante Fc ensayado. Las ratas de lisis para el anticuerpo 4D5 con mutantes Fc se dividieron por la rata de lisis mediada por el anticuerpo 4D5 de tipo salvaje. Los datos de al menos 2 ensayos independientes se promediaron y se representaron en el histograma. Para cada mutante Fc se muestran datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes. Las concentraciones de anticuerpo se eligieron para flanquear el punto a lo largo de la curva a la que la lisis era ~50%.

Figura 24 Ratas relativas de la lisis de células DAUDI mediada por mutantes FC quiméricos que alojan 2H7

- 20 Las ratas relativas de lisis se calcularon para cada mutante Fc ensayado. Las ratas de lisis para el anticuerpo 2H7 con mutantes Fc se dividieron por la rata de lisis mediada por el anticuerpo 2H7 de tipo salvaje. Los datos de al menos 1-2 ensayos independientes se promediaron y se representaron en el histograma. Para cada mutante Fc, se muestran los datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes. Las concentraciones de anticuerpo se eligieron en base al punto a lo largo de la curva en el que la lisis era ~50%.

Figura 25 Esquema para la producción de bibliotecas.

- 25 Se representan las cadenas de ADN. Las flechas hacia delante representan cebadores que contienen codones mutantes. La flecha hacia atrás representa el oligo específico del gen reverso.

Figura 26 Estrategia para la producción de bibliotecas mediante la construcción de construir un protocolo genético.

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

Figura 27 Mutantes novedosos de Fc mejoran ADCC medicado por PBMC en células SKBR3.

La gráfica muestra un análisis de regresión lineal de un ensayo estándar de ADCC. Se tituló el anticuerpo a lo largo de 3 registros utilizando una relación efector a diana de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR)/(MR - SR) * 100.

Figura 28 Mutantes novedosos de Fc mejoran ADCC medicado por PBMC en células DAUDI.

- 35 La gráfica muestra un análisis de regresión lineal de un ensayo estándar de ADCC. Se tituló el anticuerpo a lo largo de 3 registros utilizando una relación efector a diana de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR)/(MR - SR) * 100.

Figura 29 Fc Perfiles de receptores vía FACS sobre tratamiento con citoquina de monocitos.

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

Figura 30 Mejoramiento de material celular de tumor utilizando mutantes de Fc en monocitos derivados de macrófagos basados en ADCC.

- 45 La concentración de MAbs de Ch4D5 sobre 2 registros se ensayó utilizando la relación efector:objetivo de 35:1. El porcentaje de lisis se calculó como en la Figura 28.

Figura 31 Diagrama de flujo de ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento.

El diagrama de flujo resume los ensayos de CDC utilizados.

Figura 32 Actividad de citotoxicidad dependiente de complemento

Los mutantes Fc que muestran una unión mejorada a Fc γ R11A también mostraron una actividad mejorada del complemento. Se valoró el ChMAb anti-CD20 de más de 3 órdenes de magnitud. El porcentaje de lisis se calculó como en la Figura 28.

Figura 33 Árbol de decisión para la selección de mutantes Fc

- 5 Un protocolo de ejemplo para seleccionar mutantes Fc.

Figura 34 C1q con unión al anticuerpo 2B6

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

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

- 10 Figuras 35 A-D C1q con unión al anticuerpo mutante 2B6.

Sensograma de unión en tiempo real de mutantes 2B6 a C1q (3.25 nM). Los mutantes representados 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).

Las Figuras. 36 A-D Variantes de Fc con unión disminuida a Fc γ R11B

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

Figuras 37 A-D Características cinéticas de mutantes 4D5 seleccionados de disminuciones de Fc γ R11B/ selección Fc γ R11AH131

- 20 Unión de FcR a anticuerpos ch4D5 que portaban diferentes mutaciones Fc seleccionadas por disminución de CD32B y estrategia de selección de CD32A H131. El K_D se analizó a diferentes concentraciones de FcR; 400 nM CD16A 158V; 800 nM CD16A 158F; 200 nM CD32B; 200 nM CD32A 131H. El análisis se realizó usando K_D separado usando el software Biacore 3000.

- 25 Figura 38. Gráfica de datos MDM ADCC contra el $K_{APAGADO}$ determinados para unión CD32A 131H determinada 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).

5. Descripción de las realizaciones preferidas

- 30 La presente invención se refiere a moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc de IgG1 humana variante, que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyendo inserciones o eliminaciones) como se define en reivindicación 1 en una o más regiones, modificaciones que alteran, por ejemplo, el aumento o la disminución, la afinidad de la región Fc variante para un Fc γ R. En algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos
- 35 relativas a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante se une a Fc γ R11A con una mayor afinidad, con relación a una molécula comparable, es decir, que es la misma que dicha molécula con una región Fc variante pero que no tiene las modificaciones de aminoácidos, que comprende la región Fc de tipo salvaje determinada por métodos conocidos por un experto en la técnica para determinar las interacciones y los métodos de Fc-Fc γ R descritos en el presente documento, por ejemplo, un ensayo ELISA o un ensayo de resonancia de plasmón
- 40 superficial.

- En una realización preferida, las moléculas de la invención se unen específicamente a Fc γ R11B (a través de la región Fc) con una afinidad más baja que la de una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje cuando se une a Fc γ R11B. En algunas realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de
- 45 tipo salvaje, cuya región Fc variante se une a Fc γ R11A y Fc γ R11B con una mayor afinidad, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, donde dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante se une a Fc γ R11B con una mayor afinidad, con relación a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje. En otras
- 50 realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante se une a Fc γ R11B con una afinidad reducida, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc

de tipo salvaje.

5 En una realización específica, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante sólo se une a un Fc γ R, en el que dicho Fc γ R es Fc γ IIIa. La invención se refiere particularmente a la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales antiangiogénicos o antiinflamatorios específicos de tumores) para aumentar la eficacia de anticuerpos terapéuticos mejorando, por ejemplo, la función efectora de los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, mejorando ADCC.

10 Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un Fc γ R se determinan inicialmente utilizando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-Fc γ R, es decir, la unión específica de una región Fc a un Fc γ R incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 5.2.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan también por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de Fc γ R (véase la sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados aquí) como aquellos en ensayos basados en *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiban el fenotipo deseado en ensayos basados en *in vitro*, pero sí muestran el fenotipo deseado *in vivo*.

20 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 extendiéndose desde los aminoácidos 342-447. En otras realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como extendiéndose desde los aminoácidos 231-341. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos, en las que una modificación está en la región CH3 y una modificación está en la región CH2. La invención comprende 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 para un Fc γ R determinado según los métodos descritos en el presente documento o conocidos por un experto en la técnica.

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

30 En realizaciones particularmente preferidas, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante en la que dicha variante tiene una unión aumentada a Fc γ RIIA (CD32A) y/o una actividad incrementada de ADCC. Medido usando métodos conocidos por un experto en la técnica y ejemplificados en el presente documento. Los ensayos ADCC usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden depender de NK o depender de macrófagos.

35 Las variantes de Fc de la presente invención se pueden combinar con otras modificaciones de Fc conocidas que incluyen, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora y la modificación que alteran la afinidad de unión a Fc γ R.

Las variantes Fc de la presente invención se pueden combinar con cualquiera de las modificaciones Fc conocidas en la técnica tales como las que se describen en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Sustituciones
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

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

D265G

D265N

S239E/D265G

S239E/D265N

S239E/D265Q

Y296E
Y296Q
S298T
S298N
T299I
A327S
A327N
S267Q/A327S
S267L/A327S
A327L
P329F
A330L
A330Y
I332D
N297S
N297D
N297S/I332E
N297D/I332E
N297E/I332E
D265Y/N297D/I332E
D265Y/N297D/T299L/I332E
D265F/N297E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
I332N
I332Q
V264T
V264F
V240I
V263I
V266I
T299A
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
V2641/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
Y296T
Y296L
Y296I
A298H
T299H
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/D265V/N297D/I332E
S239D/D265I/N297D/I332E
S239D/D265L/N297D/I332E
S239D/D265F/N297D/I332E
S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/D265T/N297D/I332E
V264I/N297D/I332E

Y296D/N297D/I332E
Y296E/N297D/I332E
Y296N/N297D/I332E
Y296Q/N297D/I332E
Y296H/N297D/I332E
Y296T/N297D/I332E
N297D/T299V/I332E
N297D/T299I/I332E
N297D/T299L/I332E
N297D/T299F/I332E
N297D/T299H/I332E
N297D/T299E/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
*K326A
S298A
E333A
K334A
E430A
T359A
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
H268A
E272A
E430A
A330K

R301M

H268N

H268S

E272Q

N286Q

N286S

N286D

K290S

K320M

K320Q

K320E

K320R

K322E

K326S

K326D

K326E

A330K

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

K246A

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
K246M
K248M
Y300F
A330Q
K338M
K340M
A378Q
Y391F

En otras realizaciones, las variantes Fc de la presente invención pueden combinarse con cualquiera de las modificaciones Fc conocidas en la técnica tales como las que se describen en las Tablas 3A y B a continuación.

Tabla 3A

Variante de inicio	de	Posición 300	Posición 298	Posición 296	Posición 295	Posición 294
Y3001 +	→	-	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A,	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o	E294N, E294A, E294Q, o

ES 2 637 491 T3

		S298G, S298T, o S298L.		Q295A.	E294D.
Y300L + →	-	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L.	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
S298N + →	Y300I, Y300L, O Y300F.	-	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
S298V + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	-	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
S298D + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	-	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
S298P + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	-	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
Y296P + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L.	-	Q295K, Q295L, o Q295A.	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
Q295K + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L.	Y296P, Y296F, o N276Q.	-	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
Q295L + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L.	Y296P, Y296F, o N276Q.	-	E294N, E294A, E294Q, o E294D.
E294N + →	Y300I, Y300L, o Y300F.	S298N, S298V, S298D, S298P, S298A, S298G, S298T, o S298L.	Y296P, Y296F, o N276Q.	Q295K, Q295L, o Q295A.	-
** Téngase en cuenta que la tabla utiliza la numeración de la UE como en Kabat.					

ES 2 637 491 T3

Tabla 3B

Variante de inicio	Posición 334	Posición 333	Posición 324	Posición 286	Posición 276
Y300I +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A, o N276K.
Y300L +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A, o N276K.
S298N +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A, o N276K.
S298V +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q.
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A. o N276K.
S298D +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q.
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A, o N276K.
S298P +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N286D.	N276A, o N276K.
Y296P +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q,	N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y,	E333N, E333S, E333K, E333R,	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o	N276A. o N276K.

	K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333D, o E333G.		N286D.
Q295K +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q, N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N276A, o N276K.
Q295L +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q, N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N276A, o N276K.
E294N +	K334A, K334R, K334Q,	E33A, E333Q,	S324A, S324N,	N286Q, N276Q,
□	K334N, K334S, K334E, K334D, K334M, K334Y, K334W, K334H, K334V, o K334L.	E333N, E333S, E333K, E333R, E333D, o E333G.	S324Q, S324K, o S324E.	N286S, N286A, o N276A, o N276K.

** Téngase en cuenta que la tabla utiliza la numeración de la UE como en Kabat.

5 En una realización específica preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada para un Fc γ R siempre que dicha variante de la región Fc no tiene una sustitución en las posiciones que hacen un contacto directo con Fc γ R basado en el análisis cristalográfico y estructural de las interacciones Fc-Fc γ R tales como las descritas por Sondermann et al., 2000 (Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con Fc γ R son aminoácidos 234-239 (región bisagra), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 234-239 (F/G) lazo. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que hace un contacto directo con un lazo de Fc γ R basado en el análisis estructural y cristalográfico.

15 El dominio que interactúa con Fc γ R se conecta a la región bisagra inferior y selecciona sitios dentro de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG. Los restos de aminoácidos que flanquean las posiciones reales de contacto y los residuos de aminoácidos en el dominio CH3 desempeñan un papel en las interacciones IgG/Fc γ R como se indica mediante estudios de mutagénesis y estudios usando inhibidores peptídicos pequeños, respectivamente (Sondermann et al., 2000 Nature, 406: 267-273, Diesenhofer et al., 1981, Biochemistry, 20: 2361-2370, Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604. El contacto directo tal como se utiliza en el presente documento se refiere a aquellos aminoácidos que están dentro de por lo menos 1 Å, por lo menos 2 o por lo menos 3 angstroms entre sí o dentro de un radio Van Der Waals de 1 Å, 1.2 Å, 1.5 Å, 1.7 Å o 2 Å. Una lista de ejemplo de sitios previamente identificados en el Fc que efectúa la unión de las proteínas que interactúan con Fc se enumera en la Tabla 4 siguiente. En algunas realizaciones, la invención abarca variantes de Fc que no tienen ninguna modificación en los sitios enumerados a continuación. En otras realizaciones, la invención abarca variantes de Fc que comprenden modificaciones de aminoácidos en uno o más sitios enumerados abajo en combinación con otras modificaciones descritas en el presente documento, de manera que dicha modificación tenga un efecto sinérgico o aditivo sobre la propiedad del mutante.

Tabla 4. Sitios anteriormente identificados en el Fc que efectúan la unión de proteínas Fc interactivas.

FcR-Fc	Dominio	residuo	FcRI	FcRII	FcRIII	C1q	FcRn
--------	---------	---------	------	-------	--------	-----	------

ES 2 637 491 T3

	<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>E</u>
	<u>CH2</u>	<u>254</u>					<u>C</u>
	<u>CH2</u>	<u>255</u>	<u>C</u>	<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>256</u>		<u>C</u>	<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>258</u>		<u>C</u>			
<u>B</u>	<u>CH2</u>	<u>265</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>C</u>
<u>B</u>	<u>CH2</u>	<u>267</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>268</u>		<u>C</u>	<u>C</u>		
<u>B</u>	<u>CH2</u>	<u>269</u>			<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>270</u>		<u>C</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	
	<u>CH2</u>	<u>272</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>276</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>285</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>286</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>288</u>					<u>C</u>
	<u>CH2</u>	<u>290</u>		<u>C</u>	<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>292</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>293</u>			<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>295</u>		<u>C</u>	<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>29b</u>			<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>297</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	
	<u>CH2</u>	<u>298</u>					
	<u>CH2</u>	<u>299</u>					
	<u>CH2</u>	<u>301</u>	<u>D</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		

ES 2 637 491 T3

	<u>CH2</u>	<u>311</u>					<u>C</u>
	<u>CH2</u>	<u>312</u>					<u>C</u>
	<u>CH2</u>	<u>315</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>317</u>					<u>C</u>
	<u>CH2</u>	<u>322</u>		<u>C</u>	<u>C</u>	E	
	<u>CH2</u>	<u>326</u>		<u>C</u>		E	
A,B	<u>CH2</u>	<u>327</u>	<u>D,C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		
A	<u>CH2</u>	<u>328</u>					
A	<u>CH2</u>	<u>329</u>	<u>D,C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	E	
A	<u>CH2</u>	<u>330</u>					
	<u>CH2</u>	<u>331</u>		<u>C</u>		E	
A	<u>CH2</u>	<u>332</u>					
	<u>CH2</u>	<u>333</u>			<u>C</u>	E	
	<u>CH2</u>	<u>334</u>			<u>C</u>		
	<u>CH2</u>	<u>337</u>		<u>C</u>			
	<u>CH2</u>	<u>338</u>			<u>C</u>		
	<u>CH3</u>	<u>339</u>			<u>C</u>		
	<u>CH3</u>	<u>360</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>362</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>376</u>			<u>C</u>		
	<u>CH3</u>	<u>378</u>		<u>C</u>			
	<u>CH3</u>	<u>380</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>382</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>414</u>		<u>C</u>			
	<u>CH3</u>	<u>415</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>424</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>428</u>					<u>E</u>
	<u>CH3</u>	<u>430</u>		<u>C</u>			
	<u>CH3</u>	<u>433</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>434</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>435</u>					<u>C</u>
	<u>CH3</u>	<u>436</u>					<u>C</u>

La Tabla 4 lista sitios dentro de la región Fc que se han identificado previamente como importantes para la interacción Fc-FcR. Las columnas marcadas FcR-Fc identifican la cadena Fc contactada por el FcR. Las letras identifican la referencia en la que se citaron los datos. C es Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604; D es Jefferis et al., 1995, Immunol. Lett. 44: 111-7; E es Hinton et al; 2004, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6; F es Idusogie

ES 2 637 491 T3

et al., 2000, J. Immunol. 164: 4178-4184.

Se describen aquí moléculas que comprenden regiones Fc variantes que comprenden cualquiera de las mutaciones listadas en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5. Mutaciones de ejemplo

MUTANTES DE UN SOLO SITIO	MUTANTES DE DOBLE SITIO
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S166N
A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S
T366S	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	H268D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
I377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R
K326E	R255Q, K326E
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q

ES 2 637 491 T3

S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-DELETED
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
	P247L, L406F
	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K326I, P396L
	H268D, 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
	V263Q, E272D
	K326E, A330T

5 En aún otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden regiones Fc variantes que tienen más de dos modificaciones de aminoácidos. Ejemplos de tales variantes se enumeran en la tabla siguiente (Tabla 6). La invención abarca mutaciones listadas en la Tabla 6 que comprenden además una o más modificaciones de aminoácidos tales como las que se dan a conocer en el presente documento.

Tabla 6. Variantes de combinación de ejemplo

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H268L, 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

ES 2 637 491 T3

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
K326Q, K334E, T359N, T366S
A378V, N390I, V422I
V282E, V369I, 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, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L

ES 2 637 491 T3

D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D
K290T, N390I, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, 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
P217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, 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

En algunas realizaciones, las moléculas, preferiblemente las inmunoglobulinas de la invención comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de manera que uno o más restos carbohidrato están unidos covalentemente a la molécula. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpos mejorada, por ejemplo, actividad ADCC mejorada. En algunas realizaciones, la invención comprende además anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se conocen directa o indirectamente para interactuar con un resto de carbohidrato del anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a los aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directa o indirectamente con un resto de carbohidrato de un anticuerpo son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Jefferis et al, 1995, *Immunology Letters*, 44: 111-7.

La invención abarca anticuerpos que han sido modificados introduciendo uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión a Fc γ R. Los sitios de glicosilación pueden introducirse en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invención. Como se usa en el presente documento, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo al que se unirá de forma específica y covalente un oligosacárido (es decir, hidratos de carbono que contienen dos o más azúcares simples enlazados entre sí). Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente ligadas a la cadena principal de un anticuerpo a través de enlaces N u O. La glicosilación unida a N se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Los anticuerpos de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluyendo sitios de glicosilación unidos a N y O. Cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación unida a N o enlazada por O, conocida en la técnica, se puede usar de acuerdo con la presente invención. Un sitio de glicosilación unido a N, ejemplar, que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención, es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Dicho sitio o sitios pueden introducirse en un anticuerpo de la invención usando métodos bien conocidos en la técnica a los que pertenece esta invención. Véase, por ejemplo, "In Vitro Mutagenesis," *Recombinant DNA: A Short Course*, J.D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116. Un método de ejemplo para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo para que se obtenga la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

En algunas realizaciones, la invención abarca la modificación del contenido de carbohidratos de un anticuerpo de la invención añadiendo o eliminando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de hidratos de carbono de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y abarcados dentro de la invención, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6.218.149; EP 0 359 096 B1: Publicación de los Estados Unidos No. 2002/0028486; WO 03/035835; Publicación de los Estados Unidos No. 2003/0115614; Patente de los Estados Unidos No. 6.218.149; Patente de los Estados Unidos No. 6.472.511.

En otras realizaciones, la invención abarca métodos para modificar el contenido en carbohidratos de un anticuerpo de la invención mediante la eliminación de uno o más restos carbohidrato endógenos del anticuerpo. En una realización específica, la invención abarca el desplazamiento del sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando posiciones adyacentes a 297. En una realización específica, la invención abarca la posición de modificación 296 de manera que la posición 296 y no la posición 297 está glicosilada.

5.1 Polipéptidos y anticuerpos con regiones Fc variantes

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de regiones Fc de cadena pesada de IgG1 humanas mutantes, con afinidades alteradas para diferentes receptores Fc γ R, utilizando un sistema de despliegue en levaduras. Por consiguiente, la invención se refiere a moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluye inserciones o eliminaciones) en uno o más regiones, modificaciones que alteran la afinidad de la variante de la región Fc para un Fc γ R.

Un experto en la técnica apreciará que aparte de las sustituciones de aminoácidos definidas en la reivindicación 1, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región Fc con el fin de generar una variante de la región Fc con uno o más propiedades alteradas, por ejemplo, función efectora alterada. La invención contempla la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la región Fc con el fin de reducir la unión a un Fc γ R. Preferiblemente, no más de 5, no más de 10, no más de 20, no más de 30, no más de 50 Fc de residuos de región serán eliminados de acuerdo con esta realización de la invención. La región Fc que comprende en la presente invención una o más eliminaciones de aminoácidos retendrá preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, de la región Fc de tipo salvaje. En algunas realizaciones, se mantienen una o más

propiedades de las moléculas tales como, por ejemplo, no inmunogenicidad, unión a Fc γ R1IIIA, unión a Fc γ R1IIA, o una combinación de estas propiedades.

En realizaciones alternativas, la invención abarca la inserción de aminoácidos para generar las variantes de la región Fc, variantes que tienen propiedades alteradas incluyendo la función efectora alterada. En una realización específica, la invención abarca la introducción de al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo de uno a dos residuos de aminoácidos y preferiblemente no más de 10 residuos de aminoácidos adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc identificadas en el presente documento. En otras formas de realización, la invención comprende además la introducción de al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo de uno a dos residuos de aminoácidos y preferiblemente no más de 10 residuos de aminoácidos adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc conocidas en la técnica como afectando Fc γ R interacción y/o enlazante.

La invención comprende además la incorporación de aminoácidos no naturales para generar las variantes de Fc de la invención. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica tales como los que utilizan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, véase, por ejemplo, Wang et al., 2002 Chem. Comm. 1: 1-11; Wang et al., 2001, Science, 292: 498-500; van Hest et al., 2001. Chem. Comm. 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de amino acil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang et al., 2001, J. Am. Chem. Chem. 123(44): 11089-11090; Kiick et al., 2001, FEBS Lett. 505(3): 465.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un Fc γ R se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-Fc γ R, es decir, unión específica de una región Fc a un Fc γ R incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 5.2.1). Preferentemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención se caracterizan también por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de Fc γ R (véase la sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados aquí) como aquellos en ensayos basados en *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiban el fenotipo deseado en ensayos basados en *in vitro*, pero sí muestran el fenotipo deseado *in vivo*. Un diagrama de flujo representativo de la selección y caracterización de moléculas de la invención se describe en la Figura 33.

La invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que se une con una afinidad mayor a uno o más Fc γ Rs. Tales moléculas median preferiblemente la función efectora de manera más eficaz como se describe más adelante. En otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que se une con una afinidad más débil a uno o más Fc γ Rs. 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 el bloqueo o el antagonismo, pero no la muerte de las células que llevan un antígeno diana. La reducción o eliminación de la función efectora sería deseable en los casos de enfermedad autoinmune en la que uno bloquearía los receptores activadores de Fc γ R en células efectoras (este tipo de función estaría presente en las células huésped). En general, el aumento de la función efectora se dirigiría a células tumorales y extrañas.

Las variantes de Fc de la presente invención se pueden combinar con otras modificaciones de Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar una variante de Fc de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o nuevas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferiblemente, las variantes de Fc de la invención mejoran el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante Fc de la invención se combina con un mutante conocido para unirse a Fc γ R1IIIA con una afinidad más alta que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje; la combinación con un mutante de la invención da como resultado un mayor aumento del plegamiento en la afinidad con Fc γ R1IIIA.

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

En algunas realizaciones, las variantes Fc de la presente invención se incorporan en un anticuerpo o Fc de fusión que comprende una o más glicofomas modificadas genéticamente, es decir, una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una molécula que comprende una región Fc, donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una molécula parenteral que comprende una región Fc. Las glicofomas modificadas

por ingeniería genética pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitándose a mejorar o reducir la función efectora. Las glicofomas modificadas por ingeniería pueden generarse por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo utilizando cepas de expresión manipuladas o variantes, por coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT111), expresando una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando hidratos de carbono después de que se ha expresado la molécula que comprende la región Fc. Los métodos para generar glicofomas modificadas por ingeniería genética son conocidos en la técnica, e incluyen pero no se limitan a los descritos en Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); GlycoMAb™ tecnología de ingeniería de glicosilación (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véase por ejemplo WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

Las variantes Fc de la presente invención pueden optimizarse para una variedad de propiedades. Las propiedades que se pueden optimizar incluyen, pero no se limitan a, una afinidad mejorada o reducida para una función efectora Fc γ R, mejorada o reducida. En una realización preferida, las variantes Fc de la presente invención se optimizan para poseer una afinidad mejorada para un Fc γ R activador humano, preferiblemente Fc γ R, Fc γ RIIA, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB, más preferiblemente Fc γ RIIIA. En una realización preferida alternativa, las variantes Fc se optimizan para poseer afinidad reducida para el receptor inhibidor humano Fc γ RIIB. Se prevé que estas realizaciones preferidas proporcionen anticuerpos y fusiones Fc con propiedades terapéuticas mejoradas en seres humanos, por ejemplo una función efectora mejorada y una mayor potencia anticancerígena como se describe y ejemplifica en el presente documento. Se prevé que estas realizaciones preferidas proporcionen anticuerpos y fusiones Fc con eliminación de tumores mejorada en modelos de tumor de xenoinjerto de ratón.

En una realización alternativa las variantes Fc de la presente invención se optimizan para tener una afinidad reducida por un Fc γ R humano, incluyendo pero no limitado a Fc γ RI, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIc y Fc γ RIIIB. Se prevé que estas realizaciones proporcionen anticuerpos y fusiones Fc con propiedades terapéuticas mejoradas en seres humanos, por ejemplo función efectora reducidas y toxicidad reducida.

En realizaciones alternativas las variantes de Fc de la presente invención poseen afinidad realzada o reducida para Fc γ Rs de organismos no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos y monos. Las variantes de Fc que están optimizadas para unirse a un Fc γ R no humano pueden encontrar uso en experimentación. Por ejemplo, los modelos de ratón están disponibles para una variedad de enfermedades que permiten la prueba de propiedades tales como eficacia, toxicidad y farmacocinética para un candidato de fármaco dado. Como es conocido en la técnica, las células cancerosas pueden injertarse o inyectarse en ratones para imitar un cáncer humano, un proceso denominado xenoinjerto. El ensayo de anticuerpos o fusiones Fc que comprenden variantes de Fc que están optimizadas para uno o más Fc γ R de ratón, puede proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia del anticuerpo o fusión de Fc, su mecanismo de acción y similares.

Aunque se prefiere alterar la unión a un Fc γ R, la presente invención contempla además variantes Fc con afinidad de unión alterada al receptor neonatal (FcRn). Aunque se pretende no estar limitado por un mecanismo de acción particular, se anticipa que las variantes de la región Fc con afinidad mejorada para FcRn tengan vidas medias en suero más largas, y dichas moléculas tendrán aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desea una vida media larga del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Aunque no se pretende que estén unidos por un mecanismo de acción particular, se espera que las variantes de la región Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan, por ejemplo, vidas medias más cortas, y tales moléculas pueden ser administradas, por ejemplo, a un mamífero donde un tiempo de circulación acortada 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 circular en la corriente sanguínea durante períodos prolongados. Se anticipa que las variantes de la región Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida son menos propensas a atravesar la placenta y, por lo tanto, pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

En otras realizaciones, estas variantes pueden combinarse con otras modificaciones de Fc conocidas con afinidad de FcRn alterada tales como las descritas en las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/23289; y WO 97/34631; y la Patente de los Estados Unidos No. 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, introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un fragmento de dominio Fc o de bisagra-Fc). Véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/23289; y WO 97/34631; y la patente de los Estados Unidos No. 6.277.375 para usarse en combinación con las variantes Fc de la invención. Además, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con albúmina para hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea más estable *in vivo* o tengan una vida media más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en el arte, véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales Nos. WO

93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137 y Patente Europea No. EP 413,622.

La(s) variante(s) descrita(s) en el presente documento pueden someterse a otras modificaciones, muchas veces dependiendo del uso pretendido de la variante. Tales modificaciones pueden implicar una alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o eliminación de residuos de aminoácidos), fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Dichas modificaciones adicionales pueden hacerse antes, simultáneamente o después de la modificación de aminoácidos descrita en el presente documento, que da lugar a propiedades alteradas tales como una alteración de la unión al receptor Fc y/o actividad ADCC.

Alternativa o adicionalmente, la invención abarca la combinación de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que alteran la función de citotoxicidad dependiente de unión y/o complemento de la región Fc determinada *in vitro* y/o *in vivo*. Preferiblemente, la molécula de partida de interés particular de la presente invención es normalmente una que se une a C1q y muestra citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácidos adicionales descritas en el presente documento generalmente servirán para alterar la capacidad de la molécula de partida de unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y preferiblemente abolir estas funciones efectoras. En otras realizaciones se contemplan aquí moléculas que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con una función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o ligación C1q mejorada. Por ejemplo, la molécula de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar CDC y puede ser modificada de acuerdo con las enseñanzas de la presente, de modo que adquiera estas funciones efectoras adicionales. Además, las moléculas con actividad de unión C1q preexistente, que opcionalmente tienen además la capacidad de mediar CDC, pueden modificarse de manera que una o ambas de estas actividades se alteren, por ejemplo, se realcen. En algunas realizaciones, la invención abarca regiones Fc variantes con actividad CDC alterada sin ninguna alteración en la unión C1q. En aún otras realizaciones, la invención abarca regiones Fc variantes con actividad de CDC alterada y unión de C1q alterada.

Para generar una región Fc con una función de citotoxicidad dependiente del complemento y/o unión alterada de C1q (CDC), las posiciones de aminoácidos a modificar se seleccionan generalmente entre 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 de la UE como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (199). Estas modificaciones de aminoácidos pueden combinarse con una o más modificaciones de Fc descritas en el presente documento para proporcionar un efecto sinérgico o aditivo sobre la actividad de unión a C1q y/o CDC. En otras realizaciones, la invención abarca variantes de Fc con función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o ligación C1q alterada que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 396 con leucina y en la posición 255 con leucina; o una sustitución de aminoácidos en la posición 396 con leucina y en posición 419 con histidina; una sustitución de aminoácidos en la posición 396 con leucina y en la posición 370 con ácido glutámico; una sustitución de aminoácidos en la posición 396 con leucina y en la posición 240 con alanina; Una sustitución de aminoácidos en la posición 396 con leucina y en la posición 392 con treonina; una sustitución de aminoácidos en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina. La invención abarca cualquier modificación conocida de la región Fc que altere la función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o ligación C1q tal como las descritas en Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166(4) 2571-5; Idusogie et al., *J. Immunol.* 2000 164 (8): 4178-4184.

Como se ha descrito anteriormente, la invención abarca una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, unión de C1q modificada y/o unión a FcR y, por lo tanto, actividad CDC alterada y/o actividad ADCC. En realizaciones específicas, la invención abarca regiones variantes de Fc con unión mejorada de C1q y unión mejorada de Fc γ RIII; por ejemplo con actividad ADCC mejorada y 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, se puede aumentar solamente una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, por ejemplo para generar una variante de la región Fc con actividad ADCC mejorada, pero redujo la actividad de los CDC y viceversa.

A. Mutantes con afinidades mejoradas alteradas para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA

La invención abarca moléculas que comprenden una región Fc variante que tiene modificaciones de aminoácidos que incluyen aquellas definidas en la reivindicación 1, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante para un Fc γ R de activación. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA por al menos 2 veces, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. 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, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA por más de 2 veces, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones de la invención, las modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, o 10 veces con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje.

Dichos aumentos múltiples se determinan preferiblemente mediante un ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial.

5 En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IA en al menos 2 veces, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otra
 10 realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IA en más de 2 veces, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones de la invención, las modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IA en al
 15 menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces o 10 veces la relación relativa a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje.

En una realización específica, la invención abarca moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente
 20 inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante que tienen modificaciones de aminoácidos incluyendo aquellas definidas en la reivindicación 1, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IA al menos en un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un
 25 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 150% y al menos 200%, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje.

En una realización específica, las modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la variante de la
 20 región Fc 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, en la posición 202 con metionina, y
 25 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 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
 30 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 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 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 posición 358 con metionina, en
 35 posición 379 con metionina, en posición 384 con lisina y en 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
 40 posición 396 con leucina. Ejemplos de otras sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA *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 la que dicha región Fc variante
 45 comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R1IIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en posición 330 con serina y en posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a Fc γ R1IIIA con una afinidad
 50 aproximadamente 5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 255 con leucina de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R1IIIA con una afinidad aproximadamente 1 vez mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante
 55 comprende una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en posición 359 con asparagina y en posición 366 con serina, de manera que dicha molécula se une a Fc γ R1IIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces

mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con aproximadamente 3 veces mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que 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 Fc γ R111A con una afinidad aproximadamente 1 vez más alta que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en posición 379 con leucina y en posición 420 con valina, de manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con aproximadamente una afinidad 2,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con aproximadamente 3 veces mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con una afinidad aproximadamente 4,5 veces superior que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en posición 293 con valina, en posición 295 con ácido glutámico y en posición 327 con treonina, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con aproximadamente 2 veces más de afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a FcR111A, como se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, donde dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en posición 352 con leucina, y en posición 396 con leucina, de tal manera que dicha molécula se une a Fc γ R111A con una afinidad aproximadamente 2 veces superior a la de una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R111A, determinada por un ensayo ELISA.

En una realización específica, la invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 396 con histidina. En una realización específica, la invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una afinidad mayor que una región Fc que comprende la región Fc de tipo salvaje, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 248 con metionina.

La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la proteína de tipo salvaje, en la que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 396 con leucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende el polipéptido de tipo salvaje Fc, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 379 con metionina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificación de aminoácidos relativa a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la proteína salvaje en la que dicha modificación

isoleucina. La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende el polipéptido de tipo salvaje Fc, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 372 con tirosina.

En una realización específica, la invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con aproximadamente un 2 veces mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 379 con metionina. En otra realización específica, la invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ R111A con aproximadamente 1.5 veces mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la sustitución en la posición 248 con metionina.

Las moléculas de la invención tienen una afinidad alterada para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A según se determinó usando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-Fc γ R, es decir, la unión específica de una región Fc a un Fc γ R incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 5.2.1). Preferentemente, las propiedades de unión de estas moléculas con afinidades alteradas para activar los receptores Fc γ R también están correlacionadas con su actividad determinada por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de Fc γ R (véase la sección 5.2.6), por ejemplo, las moléculas con regiones Fc variantes con mayor afinidad para Fc γ R111A tienen una actividad de ADCC mejorada. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención que tienen una propiedad de unión alterada para un receptor de Fc activador, por ejemplo, Fc γ R111A en un ensayo *in vitro* también tienen una propiedad de unión alterada en modelos *in vivo* (tales como los descritos y revelados aquí). Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiben una unión alterada de Fc γ en ensayos basados en *in vitro* pero que exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

B. Mutantes con afinidad mejorada para Fc γ R111A y reducida o sin afinidad para Fc γ R11B

En una realización específica, las moléculas de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene modificaciones de aminoácidos incluyendo las definidas en la reivindicación 1, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R111A y disminuye la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R11B, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ R111A y Fc γ R11B con afinidad de tipo salvaje. En una cierta realización, las modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución con alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333, 334, 280, 290, 294, 298 o 296; o una sustitución en la posición 298 con asparagina, valina, ácido aspártico o prolina; o una sustitución 290 con serina. En ciertas realizaciones de amino, las modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R111A en al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 300%, por lo menos el 400% y disminuye la afinidad de la variante de la región Fc para Fc γ R11B en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%.

En una realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ R111A y una afinidad disminuida o sin afinidad para Fc γ R11B, según se determina basado en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20 que lleva la región Fc de la variante comprende una sustitución en cualquiera de los siguientes de 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 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 posición

354 con fenilalanina, en 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 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, como 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.

En una realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y una afinidad disminuida o ninguna afinidad para Fc γ RIIB según se determina basado en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20 que lleva la región Fc de la variante comprende una sustitución en la posición 379 con metionina; en 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 posición 334 con ácido glutámico; en posición 275 con tirosina; en posición 398 con valina.

La invención abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 3 veces inferior a un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden

la 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 el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 10-15 veces inferior a una que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la 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 el que dicha región Fc variante comprende

modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 10 veces inferior a un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje determinada por un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la 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 el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 7 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la 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 el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 3 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden la 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 el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos relativas a una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 5 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden

la sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina. La invención también abarca un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo salvaje, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad aproximadamente 2 veces menor que un polipéptido comparable. Que comprende la región Fc de tipo salvaje según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dichas modificaciones de aminoácidos comprenden

la 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 Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB

La invención abarca moléculas que comprenden regiones Fc variantes, que tienen modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB en al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 300%, al menos 400% y disminuye la afinidad de la variante de la región Fc para Fc γ RIIB por lo menos el 65%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%,

por lo menos el 95%, por lo menos el 99%, por lo menos el 100%, por lo menos el 200%, por lo menos el 300%, por lo menos el 400%. En una realización específica, la molécula de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y una afinidad mejorada para Fc γ RIIB (según se determina basado en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20 que lleva la región Fc variante como se describe en el presente documento) 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 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 posición 375 con cisteína y en 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 posición 345 con lisina y en 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 posición 398 con glutamina; o una sustitución en la posición 326 con glutamina; en posición 334 con ácido glutámico, en 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 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 la 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 posición 221 con tirosina, en posición 252 con isoleucina, en posición 330 con glicina, en posición 339 con treonina, en posición 359 con asparagina, en posición 422 con isoleucina, y en 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 y una eliminación en la posición 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 la prolina, en la posición 274 con asparagina, en la posición 287 con glicina, en la posición 334 con asparagina, en el 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; en 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 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 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 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 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 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 posición 369 con alanina, en posición 393 con alanina y en 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 posición 419 con arginina y en 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 posición 362 con histidina, en posición 384 con lisina y en posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina; o una 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 por 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.

D. Mutantes con funciones alteradas del efecto medicado por Fc γ R

La invención abarca inmunoglobulina que comprende variantes de Fc con funciones efectoras alteradas. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes de Fc median la función efectora de manera más eficaz en presencia de células efectoras según se determina usando ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes de Fc median la función efectora de manera menos eficaz en presencia de células efectoras determinadas mediante ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. En realizaciones específicas, las variantes Fc de la invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc conocidas que alteran la función efectora, de tal manera que la combinación tiene un efecto sinérgico aditivo. Las variantes de Fc de la invención han alterado la función efectora *in vitro* y/o *in vivo*.

En una realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen una función efectora mediada por Fc γ R mejorada según se determina usando los ensayos de actividad de ADCC descritos en el presente documento. Ejemplos de funciones efectoras que podrían ser mediadas por las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a unión de C1q, citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, etc. Las funciones efectoras de las moléculas de la invención pueden ensayarse usando métodos estándar conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales 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 para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA median la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) 2 veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención que comprenden una región Fc variante con mayor afinidad para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA median citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen actividad de unión a C1q alterada. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces mayor que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje. Todavía en otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen citotoxicidad dependiente del complemento alterada. En aún otra realización específica, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen una citotoxicidad dependiente del complemento mejorada que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, por lo menos 10⁵ veces superior a la citotoxicidad dependiente del complemento que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje.

En otras realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA tienen actividad de fagocitosis mejorada con respecto a una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje, según se determina mediante ensayos estándar conocidos por un experto en la técnica o descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la invención con afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA tienen actividad de fagocitosis al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces mayor a una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo salvaje.

En una realización específica, la invención abarca una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante con modificaciones de aminoácidos, con una afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos o fagocitosis. En una realización específica, las modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA 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 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 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.

En otra realización específica, las modificaciones de aminoácidos que aumentan la actividad ADCC de la inmunoglobulina son cualquiera de las mutaciones enumeradas a continuación, en la Tabla 7.

Tabla 7. Modificación de aminoácidos con ADCC incrementado

E333A, K334A
R292L, K334E
V379M
S219Y
V282M
K222N
F243I, V379L
F243L, R255L, E318K
K334I
K334E, T359N, T366S
K288M, K334E
K288N, A330S, P396L
K326E
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
F243I, V379L, G420V
E293V, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L

ES 2 637 491 T3

K392T,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
Q419H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
R255L, P396L
V240A, P396L
T250S, P396L
P247S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
L410H, P396L
Q419L,P396L
V427A, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
E258D, P396L
N384K, P396L
V323I, P396I
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L

P244H, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L
D270E, G316D, R416G
P247L, N421K
P247L, N421K, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
K392T, P396L, D270E

5 Alternativamente o adicionalmente, puede ser útil combinar las modificaciones de aminoácidos anteriores o cualquier otra modificación de aminoácidos descrita en el presente documento con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que alteren la función de citotoxicidad dependiente de C1q y/o dependiente del complemento de la región Fc. La molécula de partida de interés particular en el presente documento es usualmente una que se une a C1q y muestra citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácidos adicionales descritas en el presente documento generalmente servirán para alterar la capacidad de la molécula de partida de unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y preferiblemente abolir estas funciones efectoras. Sin embargo, aquí se contemplan moléculas que comprenden 10 sustituciones en una o más de las posiciones descritas con una función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o ligación C1q mejorada. Por ejemplo, la molécula de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar CDC y puede ser modificada de acuerdo con las enseñanzas de la presente, de modo que adquiera estas funciones efectoras adicionales. Además, las moléculas con actividad de unión C1q preexistente, que 15 opcionalmente tienen además la capacidad de mediar en CDC, pueden modificarse de manera que se potencien una o ambas de estas actividades.

Como se ha descrito anteriormente, se puede diseñar una región Fc con una función efectora alterada, por ejemplo, modificando la unión de C1q y/o a FcR y cambiando de ese modo la actividad de CDC y/o la actividad de ADCC. Por ejemplo, se puede generar una región Fc variante con una unión C1q mejorada y una unión Fc γ RIII mejorada; por ejemplo, que tiene actividad ADCC mejorada y actividad CDC mejorada. Alternativamente, cuando se desea que la 20 función efectora se reduzca o se elimine, se puede diseñar una región Fc variante con actividad CDC reducida y/o actividad ADCC reducida. En otras realizaciones, se puede aumentar solamente una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, por ejemplo, para generar una variante de la región Fc con actividad ADCC mejorada, pero reduciendo la actividad de los CDC y viceversa.

La invención abarca variantes específicas de la región Fc que se han identificado utilizando los métodos de la invención a partir de una biblioteca de levaduras de mutantes después de la segunda y cuarta ronda de clasificación se enumeran en la Tabla 8. La Tabla 8 resume los diversos mutantes que se identificaron usando la métodos de la invención. Los mutantes se ensayaron utilizando un ensayo de ELISA para determinar la unión a Fc γ RIII A y Fc γ RIB. Los mutantes también se ensayaron en un ensayo ADCC, clonando las variantes Fc en un anticuerpo ch 4-4-20 usando métodos descritos y ejemplificados en el presente documento. Los artículos en negrita se refieren a 25 experimentos, en los que el ch4-4-20 se purificaron antes del ensayo de ADCC. La concentración de anticuerpos utilizada estaba en el intervalo de 0,5 μ g/ml a 1,0 μ g/ml. 30

ES 2 637 491 T3

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))
biblioteca pYD-CH1 criba FACS con tetramero 3A				
Q347H; A339V	CH3	↑0.5x	NT	
S415I; 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	
N315I	CH2	N/C	↑.75x	
S132I	CH1	N/C	NT	
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 dirigidos al sitio 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

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
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-biblioteca 4-4-20				
Aumento de la unión a FcγRIIIA, disminución o no cambio a la unión FcγRIIB N/C significa ningún cambio; N/B significa que no hay unión; NT significa no probado				
V379M	CH3	T2x	N/C	1.47
S219Y	Bisagra	↑1x	↓□o N/B	1.28
V282M	CH2	↑1x	↓□o 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	↓□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
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	T 3x	↓□o 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	

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
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	
P247L, I253N, K334N	CH2	↑3x	↑2.5x	
P247L	CH2	↑0.5x	↑4x	0.91; 0.84
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	
D312E,K327N,I378S	CH2,CH3	↑0.5x	N/C	
K288N, K326N	CH2	↑1X	N/C	
F275Y	CH2	↑3x	N/C	0.64
P247L,N421K	CH2,CH3	↑3x	N/C	2.0
S298N,W381R	CH2,CH3	↑2x	N/C	
D28UE,S354F,A431D,L441I	CH2,CH3	↑3x	N/C	0.62
R255Q,K326E	CH2	↑2x	N/C	0.79
K218R,G281D,G385R H,	CH2,CH3	↑3.5x	N/C	0.67
L398V	CH3	↑1.5x	N/C	
P247L,A330T,S440G	CH2,CH3	↑0.75x	↓0.25x	
V284A,F372L	CH2,CH3	1x	N/C	

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	1.25x	N/C	
P247L,A431V,S442F	CH2,CH3	1x	N/C	
Aumento de la unión a FcγRIIIA y FcγRIIB 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	T4x	
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	

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
F241L,E258G	CH2	↑2x	↑2.5x	-0.08
K370N,S440N	CH3	↑1x	↑3.5x	
K317N,F423-deleted	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,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑4x	
Aumento de la unión a FcγRIIB pero no 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	
Disminución de la unión a FcγRIIIA 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	

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a Fc γ R1IIIA (ELISA)	Unión a Fc γ R1IIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
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	
Disminución Fc γ R1IIB/selección Fc γ R1IIIA: biblioteca Fc ingenua				
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
Biblioteca de competición de soluciones 40X Fc γ R1IIB-G2:P396L				
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D		↑3.6x	↑0.1x	3.17
Criba de equilibrio: monómero Fc γ R1IIIA 0,8 μ M: biblioteca P396L				
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	↑2.8x	↑6.1x	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
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
Criba cinética: 0,8 μ M, 1' con Fc γ R1IIIA frío 8 μ M: Biblioteca P396L				
terminos M, P396L	CH3	↑1.9x	↑7.2x	3.09
Q419H,P396L	CH3	↑2x	↑6.9x	2.24
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑6.6x	2.47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑2.5x	↑4.1x	2.4

ES 2 637 491 T3

Mutaciones	Dominio	Unión a Fc γ R1IIIA (ELISA)	Unión a Fc γ R1IIB (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
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
T250S, P396L	CH2, CH3	↑1.5x	↑6.8x	1.60
P247S, P396L	CH2,CH3	↑1.2x	↑4.2x	2.10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2,CH3	↑1.3x	↑6.7x	1.55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2,CH3	↑2.7x	↑8.7x	1.88
L410H, P396L	CH3	↑1.7x	↑4.5x	2.00
Q419L,P396L	CH3	↑2.2x	↑6.1x	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	↑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, Q362H, 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
Disminución Fc γ R1IIB FC γ R1IIIA 158V selección en fase sólida: Biblioteca ingenua				
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

Mutaciones	Dominio	Unión a Fc γ R111A (ELISA)	Unión a Fc γ R111B (ELISA)	4-4-20 ADCC (Lisis Relativa (Mut/Wt))
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, 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
Diminución Fc γ R111B Fc γ R111A 158F selección en fase sólida: Biblioteca ingenua				
158F por FACS top 0.2%				
V284M, S298N, K334E, R355W R416T	CH2, CH3	NT	NT	
Disminución Fc γ R111B Fc γ R111A 131H selección en fase sólida: Biblioteca ingenua				
R292P, V305I	CH2,CH2	NT	NT	
D270E, G316D, R416G	CH2,CH3	NT	NT	
V284M, R292L, K370N	CH2,CH3	NT	NT	
R292P, V305I, F243L	CH2	NT	NT	

5 En realizaciones preferidas, la invención proporciona moléculas de inmunoglobulina modificadas (por ejemplo, anticuerpos) con regiones Fc variantes, que tienen modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la molécula para Fc γ R111A y/o Fc γ R111A. Tales inmunoglobulinas incluyen moléculas de IgG que contienen naturalmente regiones de unión a Fc γ R (por ejemplo, región de unión a Fc γ R111A y/o Fc γ R111) o derivados de inmunoglobulina que han sido modificados genéticamente para contener una región de unión Fc γ R (por ejemplo, región de unión Fc γ R111A y/o Fc γ R111B). Las inmunoglobulinas modificadas de la invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferiblemente, inmunoespecíficamente, es decir, compete contra la unión no específica determinada por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar un antígeno antígeno-anticuerpo específico y contiene un Fc γ R (por ejemplo, una región de unión a Fc γ R111A y/o Fc γ R111B). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos por disulfuro y fragmentos que contienen un dominio VL o VH o incluso una región determinante complementaria (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, diseñados para 10 contener o fusionarse a una región de unión a Fc γ R.

También se describen moléculas que comprenden porciones de una región Fc. Como se usa aquí, el término porción de una región Fc se refiere a fragmentos de la región Fc, preferiblemente una porción con actividad efectora

y/o actividad de unión a Fc γ R (o una región comparable de un mutante que carece de tal actividad). El fragmento de una región Fc puede variar en tamaño desde 5 aminoácidos hasta toda la región Fc menos un aminoácido. La porción de una región Fc puede faltar hasta 10, hasta 20, hasta 30 aminoácidos desde el extremo N-terminal o C-terminal.

- 5 Las moléculas de IgG de la invención son preferiblemente subclase IgG1 de IgG, pero también pueden ser cualquier otra subclase de IgG de animales dados. Por ejemplo, en seres humanos, la clase IgG incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgG de ratón incluye IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

10 Las inmunoglobulinas (y otros polipéptidos usados en el presente documento) pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, roedores (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo. Como se usan en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, Por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,939,598 de Kucherlapati et al.

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido o pueden ser específicos para epítomos heterólogos, tales como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol., 147:60-69, 1991; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 20 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553, 1992.

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Mientras que tales moléculas normalmente sólo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están abarcados por la presente invención. Ejemplos de BsAbs incluyen sin limitación aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de células 25 tumorales y el otro brazo dirigido contra una molécula citotóxica.

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas de 30 cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et al., Nature, 305: 537-539, (1983). Debido al surgido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en WO 93/08829, y en Trauneker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

35 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de antígeno-anticuerpo) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de 40 cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a 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 de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas 45 utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena 50 pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadenas pesadas de cadena ligera/cadena de inmunoglobulina híbrida (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 indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos 55 biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986). De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, un par de moléculas de anticuerpo pueden ser modificadas genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo 60 se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades"

compensatorias de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

- 5 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, y el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes reticulantes adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

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

- 15 Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que están modificados de otro modo, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal manera que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una al antígeno y/o genere una respuesta antiidiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, 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.

- 20 Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. 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 et al., BioTechniques, 4: 214 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397.

- 30 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones estructurales y dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos estructurales en las regiones estructurales humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones del CDR y los residuos estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature, 332:323, 1988.

- 40 Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, el injerto de CDR (EP 239,400, publicación PCT WO 91/09967, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), recubrimiento o repavimentación (EP 592,106, EP 519,596, Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5): 489-498, 1991, Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6): 805-814, 1994, Roguska et al., Proc Natl Acad Sci. USA, 91: 969-973, 1994), y el arrastre de cadena (Patente de los Estados Unidos No. 5,565,332).

- 45 Los anticuerpos humanizados pueden generarse utilizando cualquiera de los métodos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 Publicaciones de los Estados Unidos Nos. 20040049014, 200300229208.

- 50 Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo procedimientos de presentación de fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

- 55 También se pueden producir anticuerpos humanos 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 and Huszar. Int. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, publicaciones

PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente Europea No. 0 598 877; Patentes de los Estados Unidos Nos. 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.

5 Además, se pueden utilizar los servicios de compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San José, CA) para obtener anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

10 Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., Bio/technology, 12: 899-903, 1988).

15 La invención abarca la ingeniería de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc, por modificación de residuos de aminoácidos como se define en la reivindicación 1, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. En otra realización, la invención se refiere a la ingeniería de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc, mediante la modificación de residuos de aminoácidos, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A y disminuye adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B. Los anticuerpos terapéuticos diseñados pueden tener adicionalmente una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., según se determina mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

20 En una realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, el anticuerpo humanizado Ab4D5 como se describe en Carter et al., 1992, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 89: 4285-9) por modificación de restos de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal humanizado Her2/neu también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B.

25 En aún otra realización específica, los anticuerpos monoclonales humanizados modificados genéticamente específicos para Her2/neu pueden tener adicionalmente una función efectora mejorada determinada por ensayos convencionales conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados aquí.

30 En otra realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano de ratón, 2H7 por modificación de residuos de aminoácidos, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc para Fc γ R11B. En aún otra realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado, 2H7 puede tener adicionalmente una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y se describen y ejemplifican aquí.

35 En otra realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo anti-Fc γ R11B que incluye pero no se limita a cualquiera de los anticuerpos descritos en la Solicitud US No. 10/643.857 presentada el 14 de agosto de 2003, que tiene el Expediente de Apoderado No. 011183-010- 999, por modificación de los residuos de aminoácidos, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc γ R111A y/o Fc γ R11A. Ejemplos de anticuerpos anti-Fc γ R11B que pueden ser manipulados de acuerdo con los métodos de la invención son anticuerpos monoclonales
40 2B6 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4591 y 3H7 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4592, anticuerpo monoclonal 1D5 que tiene el número de acceso ATCC PTA- 5958, el anticuerpo monoclonal 1F2 con el número de acceso ATCC PTA-5959, el anticuerpo monoclonal 2D11 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5960, el anticuerpo monoclonal 2E1 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5961 y el anticuerpo monoclonal 2H9 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5962 (todos depositados a 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-Fc γ R11B también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc para Fc γ R11B. En otra realización específica, el anticuerpo anti-Fc γ R11B diseñado puede tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal 2B6 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 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) (véase la Tabla
60 5).

5.1.1 Conjugados de polipéptidos y anticuerpos

Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden ser fusionadas recombinantemente o conjugadas químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado o parte de los mismos, preferiblemente 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 no necesariamente tiene que ser directa, sino que puede ocurrir a través de secuencias enlazadoras.

Además, las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden conjugarse con un agente terapéutico o un resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o restos de fármacos no se deben interpretar como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto 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 diftérica, ricina, gelonina y proteína antiviral de hierba carmín, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α -interferones incluyendo (IFN- α), β -interferón (IFN- β), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el activador de plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo TNF- α , TNF- β , AIM I como se describe en la Publicación PCT No. WO 97/33899), AIM II (véase la Publicación PCT No. WO 97/34911), Fas Ligand (Takahashi et al., *J. Immunol.*, 6: 1567-1574, 1994) y VEGF (publicación PCT No. WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, un factor estimulante de la linfoquina (por ejemplo, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos ("GM-CSF"), y el factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En las realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcador es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., *Cell*, 37: 767, 1984) (Knappik et al., *Biotechniques*, 17 (4): 754-761, 1994).

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de mezcla de genes, reordenamiento de motivos, mezcla de exones y/o mezcla de codones (denominadas colectivamente "mezclas de ADN"). La mezcla de ADN puede emplearse para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas). Véase, en general, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten et al., 1997, *Curr. Opinión Biotechnol.* 8: 724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo and Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, pueden alterarse adicionalmente sometiéndose a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención, se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

La presente invención también abarca moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes (es decir, anticuerpos, polipéptidos) conjugadas con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la vida media en suero y/o dirigirse a un subconjunto particular de células. Las moléculas de la invención se pueden utilizar de forma diagnóstica para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando las moléculas de la invención a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse bien directamente a las moléculas de la invención o indirectamente, a través de un intermediario (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Dicho diagnóstico y detección puede lograrse acoplando las moléculas de la invención a sustancias detectables incluyendo, pero no limitadas a, diversas enzimas, enzimas incluyendo, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos protésicos tales como, pero no limitados a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero

no limitados a, luciferasa, luciferina y aequorina; material radiactivo tal como, pero sin limitación, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (Y), zinc (Zn); positrones que emiten metales usando diversas tomas de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden una región Fc variante pueden conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (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, emitina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos o homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, decarbazina 5-fluorouracilo), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, 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 antramycin (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula de la invención puede conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radioactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometales (véase más arriba ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''-tetraacético (DOTA) que puede ser unido al anticuerpo mediante una molécula de enlace. Dichas moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4: 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman et al., 1999, Nucl. Medicina. Biol. 26: 943-50.

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

En una realización, en la que la molécula de la invención es un anticuerpo que comprende una región Fc variante, puede administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado a ella, administrada sola o en combinación con factor(es) citotóxico y/o citoquinas para uso como tratamiento terapéutico. Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe por Segal en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980. Los anticuerpos de la invención también pueden estar unidos a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliácridamida, nilón, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.2 Criba de moléculas con regiones variantes Fc para una unión y caracterización mejorada de Fc γ RIII de la misma

El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas de Fc γ R (por ejemplo, afinidad de Fc γ RIII mejorada) se pueden hacer usando la tecnología de visualización por levadura como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-Fc γ R, es decir, unión específica de una región Fc a un Fc γ R, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón de superficie, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis de equilibrio. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades alteradas de Fc γ R (por ejemplo, afinidad de Fc γ RIII mejorada) se pueden hacer usando la tecnología de despliegue en levaduras como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los ensayos basados funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R tales como las descritas en la presente en la sección 5.2.7. Ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras que pueden usarse de acuerdo con los

métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a células, rosetado, unión a C1q y moléculas de complemento que comprenden regiones Fc variantes con afinidades de Fc γ R alteradas (por ejemplo, afinidad de Fc γ RIIIA mejorada) se puede hacer usando la tecnología de despliegue en levaduras como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica en combinación o en paralelo con uno o más ensayos basados funcionales, preferiblemente a un alto rendimiento.

El término "unión específica" de una región Fc a un Fc γ R se refiere a una interacción de la región Fc y un Fc γ R particular que tiene una constante de afinidad de al menos aproximadamente 150 nM, en el caso del Fc γ RIIIA monomérico y al menos aproximadamente 60 nM en el caso de Fc γ RIIB dimérico como se determinó usando, por ejemplo, un ELISA o un ensayo de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, un BIAcore™). La constante de afinidad de una región Fc para Fc γ RIIIA monomérica puede ser de 150 nM, 200 nM o 300 nM. La constante de afinidad de una región Fc para Fc γ RIIB dimérica puede ser de 60 nM, 80 nM, 90 nM o 100 nM. El Fc γ RIIB dimérico para uso en los métodos de la invención se puede generar usando métodos conocidos por un experto en la técnica. Típicamente, la región extracelular de Fc γ RIIB está unida covalentemente a un polipéptido heterólogo que es capaz de dimerización, de modo que la proteína de fusión resultante es un dímero, por ejemplo, véase la Solicitud de los Estados Unidos No. 60/439,709 presentada el 13 de Enero de 2003 (Expediente de Apoderado No. 11183-005-888), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Generalmente, una interacción específica es estable bajo condiciones fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, condiciones que se producen en un individuo vivo tal como un humano u otro vertebrado o invertebrado, así como condiciones que ocurren en un cultivo celular tales condiciones usadas para mantener y cultivar células de mamíferos o células de otro organismo vertebrado o un organismo invertebrado.

El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes y afinidades alteradas de Fc γ R pueden comprender: mostrar la molécula que comprende una región Fc variante en la superficie de levadura; y caracterizar la unión de la molécula que comprende la región Fc variante a un Fc γ R (uno o más), utilizando un ensayo bioquímico para determinar la interacción Fc-Fc γ R, preferiblemente, un ensayo basado en ELISA. Una vez que la molécula que comprende una región Fc variante se ha caracterizado por su interacción con uno o más Fc γ Rs y se determina que tiene una afinidad alterada para uno o más Fc γ Rs, por al menos un ensayo basado en bioquímicos, por ejemplo, un ensayo ELISA, la molécula puede ser manipulada en una inmunoglobulina completa, usando métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales conocidos en la técnica, y la inmunoglobulina que comprende la región Fc variante expresada en células de mamífero para su posterior caracterización bioquímica. La inmunoglobulina en la que se introduce una variante de la región Fc de la invención (por ejemplo, la sustitución de la región Fc de la inmunoglobulina) puede ser cualquier inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. En realizaciones preferidas, se introduce una región Fc variante en una inmunoglobulina específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno de cáncer. La inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante de la invención puede unirse específicamente a un antígeno de cáncer o tumor, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, antígeno de carcinoma de KS 1/4 (Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3.662-3.667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2): 468-475), fosfato de ácido prostático (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928), antígeno específico de próstata (Henttu and Vihko, 1989, Biochem Biophys Res Comm 160 (2): 903-910; Israelí, et al., 1993, Cancer Res. 53: 227-230), antígeno asociado al melanoma p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55-63, Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 13: 294), antígeno polimórfico de mucina epitelial, antígeno de glóbulos grasos de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol., 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff et al., 1994, Blood 83: 435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma como el gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36: 373-380), gangliósido GM2 (Livingstong et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250), tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA), tales como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo virus de tumor de ADN de antígeno T y antígenos de envoltura de virus de tumor de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359), antígeno linfocítico humano maligno APO-1 (Bernhard et al., 1989,

Science 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57) tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, antígeno endodermo I primario encontrado en eritrocitos adultos, embriones preimplantables, I (Ma) en los adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrados en el epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D₁56-22 encontrados en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en los adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 encontrado en el receptor EGF de las células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALe^p/Le^y) encontrado en el adenocarcinoma del colon, 19.9 encontrado en el cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en las células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4,2, G_{D3}, D₁,1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1: 22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones de 4 a 8 células. En una realización, el antígeno es un péptido derivado de receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase, Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

En algunas realizaciones, se introduce una variante de la región Fc de la invención en un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995). En otras realizaciones, se introduce una región Fc variante de la invención en un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico ratón-humano 2H7, que reconoce la fosfoproteína de superficie celular CD20 en células B (Liu et al., 1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6). En 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 et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9). En otras realizaciones, se introduce una variante de la región Fc de la invención en un anticuerpo anti-TAG72 humanizado (CC49) (Sha et al., 1994 Cancer Biother. 9(4): 341-9). En otras realizaciones, se introduce una variante de la región Fc de la invención en Rituxan que se usa para tratar linfomas.

En otra realización específica, la invención abarca la ingeniería de un anticuerpo anti-Fc_γR1IB que incluye pero no se limita a cualquiera de los anticuerpos descritos en la Solicitud de los Estados Unidos No. 10/643,857 presentada el 14 de agosto de 2003 (que tiene el documento de registro de abogado No. 011183-010-999), mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de residuos de aminoácidos cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc para Fc_γR1IIA y/o Fc_γR1IA. Ejemplos de anticuerpos anti-Fc_γR1IB que pueden ser manipulados de acuerdo con los métodos de la invención son anticuerpos monoclonales 2B6 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4591 y 3H7 que tienen el número de acceso ATCC PTA-4592, anticuerpo monoclonal 1D5 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5958, 1F2 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5959, anticuerpo monoclonal 2D11 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5960, anticuerpo monoclonal 2E1 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5961 y anticuerpo monoclonal 2H9 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5962 (todos depositados a 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-Fc_γR1IB también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc_γR1IB. En aún otra realización específica, el anticuerpo anti-Fc_γR1IB diseñado puede tener además una función efectora mejorada determinada por los ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento. En algunas realizaciones, se introduce una región Fc variante de la invención en un anticuerpo monoclonal terapéutico específico para un antígeno de cáncer o un receptor de superficie celular que incluye, pero sin limitarse a, ErbituxTM (también conocido como IMC-C225) (ImClone Systems Inc.), un anticuerpo monoclonal quimérico contra EGFR; HERCEPTIN[®] (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO[®] (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa sobre las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX[®] (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado anti-CD25 para la prevención del rechazo agudo de aloinjerto renal. Otros ejemplos son un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Celltech, Reino Unido); PRO542 que es un anticuerpo anti-gp120 de HIV fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); C14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo anti-VEGF IgG1 humanizado (Genentech); OVAREXTM que es un anticuerpo murino anti-CA 125 (Altarex); PANOREXTM que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-IA de IgG2a (Glaxo Wellcome/Centocor); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXINTM que es un anticuerpo de integrina anti-αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo humanizado anti CD52 IgG1 (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 IgG (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXANTM que es un anticuerpo anti-CD20 IgG1 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDETM que es un anticuerpo humanizado anti-CD22 IgG (Immunomedics); Smart ID10 que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYMTM (Lym-1) es un anticuerpo murino anti-HLA DR radiomarcado (Techniclone); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genetech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALINTM es un anticuerpo murino anti-CD20 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 humanizado IgG (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor de complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4

IgG1 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo anti-TNF- α IgG4 humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4B7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo humanizado anti-CD40L IgG (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo humano anti-CD64 (Fc γ R) (Medarex/Centeon); rhuMab-E25 es un anticuerpo anti-IgE IgG1 humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharm); ABX-CBL es un anticuerpo murino anti CD-147 IgM (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG anti-CD2 de rata (Medim muneBio Trasplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo murino anti-CD3 IgG2a (orto Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo anti-CD25 IgG1 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo humanizado de IgG anti- β_2 -integrina (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 quimérico anti-Factor VII (Centocor).

Las regiones Fc variantes de la invención, preferiblemente en el contexto de una inmunoglobulina, pueden caracterizarse adicionalmente utilizando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. En algunas realizaciones alternativas, las regiones Fc variantes de las invenciones no se introducen en una inmunoglobulina y se caracterizan adicionalmente usando uno o más ensayos basados en bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar interacciones FcR-Fc γ R, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA y un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial para determinar los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, por ejemplo, el ensayo BIAcore. Uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R como es conocido por un experto en la técnica o descrito en el presente documento. En realizaciones específicas, las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes se ensayan en un ensayo ELISA para la unión a uno o más Fc γ R, 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 adicionalmente usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmón superficial son bien conocidos en la técnica, y se discuten adicionalmente en la Sección 5.2.7, y se ejemplifican aquí en el Ejemplo 6.8.

Un ensayo de ejemplo de alto rendimiento para caracterizar inmunoglobulinas que comprende regiones Fc variantes puede comprender: introducir una región variante Fc 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 de la variante en un ensayo ADCC (utilizando métodos descritos en el presente documento) en el que las células diana se opsonizan con el anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante; la región Fc variante puede entonces clonarse en una segunda inmunoglobulina, por ejemplo 4D5, 2H7, y dicha segunda inmunoglobulina se caracteriza por un ensayo ADCC, en el que las células diana se opsonizan con el segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante. El segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante se analiza posteriormente utilizando un ensayo basado en ELISA para confirmar la unión específica a un Fc γ R.

Una región Fc variante de la invención se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad que una región Fc de tipo salvaje determinada en un ensayo ELISA. Más preferiblemente, una región Fc variante de la invención se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad y se une a Fc γ RIIB con una afinidad inferior a la de una región Fc de tipo salvaje determinada en un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, la región Fc variante se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con al menos 2 veces más alto, al menos 4 veces más alto, más preferiblemente al menos 6 veces más alto, más preferiblemente al menos 8 a 10 veces más alta que una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA y se une a Fc γ RIIB con al menos 2 veces menor, al menos 4 veces menor, más preferiblemente al menos 6 veces menor, lo más preferiblemente al menos una afinidad de 8 a 10 veces inferior a la de una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ RIIB según se determina en un ensayo ELISA.

La inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes puede analizarse en cualquier punto usando un ensayo basado en resonancia basado en plasmón de superficie, por ejemplo, BIAcore, para definir los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, utilizando métodos descritos en el presente documento y conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el Kd de una región Fc variante de la invención para la unión a un Fc γ RIIIA monómero y/o Fc γ RIIA según se determina mediante análisis BIAcore es aproximadamente 100 nM, de manera preferible aproximadamente 70 nM, más de manera preferible aproximadamente 40 nM; y el Kd de la variante de la región Fc de la invención para unir un Fc γ RIIB dímérico es aproximadamente 80 nM, aproximadamente 100 nM, más de manera preferible aproximadamente 200 nM.

En las realizaciones más preferidas, la inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes se caracteriza además en un modelo animal para la interacción con un Fc γ R. Los modelos animales preferidos para su uso en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan Fc γ Rs humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,877,397 y 6,676,927 que se

incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los ratones transgénicos para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, ratones Fc γ R1IIIA desnudos con supresión genética que llevan Fc γ R1IIIA humano; desnudo con supresión genética Fc γ R1IIIA ratones que llevan Fc γ R1IIA humano; Fc γ R1IIIA muy desnudo que lleva Fc γ R1IIB humano y Fc γ R1IIIA humano; desnudo con supresión genética Fc γ R1IIIA ratones que llevan Fc γ R1IIB humano y humano Fc γ R1IIA; Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IIA que llevan ratones Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IIA humanos y ratones Fc γ R1IIIA, Fc γ R1IIA y Fc γ R1IIB desnudos con supresión genética que llevan Fc γ R1IIIA, Fc γ R1IIA y Fc γ R1IIB humanos.

5.2.1 Estrategias de diseño

Se describen métodos de ingeniería para generar variantes de Fc incluyendo, pero sin limitarse a, estrategias de diseño computacional, métodos de generación de bibliotecas, y métodos de producción experimental y selección. Estas estrategias pueden aplicarse individualmente o en diversas combinaciones para diseñar las variantes Fc de la presente invención.

Los métodos de ingeniería pueden comprender métodos en los que los aminoácidos en la interfase entre una región Fc y el ligando Fc no se modifiquen. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a Fc γ R, C1q, FcRn, C3, receptor de manosa, proteína A, proteína G, receptor de manosa y moléculas no descubiertas que unen Fc. Los aminoácidos en la interfase entre una región Fc y un ligando Fc se definen como aquellos aminoácidos que hacen un contacto directo y/o indirecto entre la región Fc y el ligando, juegan un papel estructural en la determinación de la conformación de la interfase o están dentro de al menos 3 angstroms, preferiblemente al menos 2 angstroms de cada uno como se determina por análisis estructural, tal como cristalografía de rayos X y modelado molecular. Los aminoácidos en la interfase entre una región Fc y un ligando Fc incluyen aquellos aminoácidos que forman un contacto directo con un Fc γ R basado en el análisis cristalográfico y estructural de las interacciones Fc-Fc γ R tales como las descritas por Sondermann et al., (2000, Nature, 406: 267-273).

Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con Fc γ R son aminoácidos 234-239 (región bisagra), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (C/E bucle), y aminoácidos 327-332 (F/G) lazo. Las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes que comprenden la modificación de al menos un residuo que no hace contacto directo con un Fc γ R con base en análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión Fc-Fc γ R.

Preferiblemente, los métodos de ingeniería no modifican ninguno de los aminoácidos identificados por Shields et al. que están situadas en el dominio CH2 de una región Fc próxima a la región bisagra, por ejemplo, Leu234-Pro238; Ala327, Pro329, y afectan la unión de una región Fc a todos los Fc γ R humanos.

En otras realizaciones, la invención abarca variantes de Fc con afinidades de Fc γ R alteradas y/o funciones efectoras alteradas, de manera que la variante de Fc no tiene una modificación de aminoácido en una posición en la interfaz entre una región Fc y el ligando Fc. Preferiblemente, tales variantes de Fc en combinación con una o más modificaciones de aminoácidos que están en la interfase entre una región Fc y el ligando Fc tienen un impacto adicional sobre la propiedad alterada particular, por ejemplo, alterado Fc γ R afinidad. La modificación de aminoácidos en la interfase entre Fc y un ligando Fc puede hacerse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo basándose en el análisis estructural de complejos Fc-ligandos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, explorando sustituciones energéticamente favorables en las posiciones Fc que afectan a la interfaz de unión, se pueden diseñar variantes que muestren nuevas conformaciones de interfaz, algunas de las cuales pueden mejorar la unión al ligando Fc, algunas de las cuales pueden reducir el ligando Fc y algunas de las cuales pueden tener otras propiedades favorables. Tales nuevas conformaciones de interfaz podrían ser el resultado de, por ejemplo, interacción directa con residuos de ligando de Fc que forman la interfase, o efectos indirectos causados por modificaciones de aminoácidos tales como la perturbación de las conformaciones de cadena lateral o de cadena principal.

La invención abarca variantes de Fc de ingeniería que comprenden cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento en combinación 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 de N297 que dan lugar a una propiedad deseada, por ejemplo, afinidad aumentada o reducida para un Fc γ R. Tales modificaciones pueden mejorar aún más el fenotipo de la modificación de aminoácidos original de las variantes Fc de la invención. Aunque no se pretende estar limitado por un mecanismo de acción particular, dicha estrategia está respaldada por la observación de que la estructura y conformación de carbohidratos afectan dramáticamente a la unión de Fc-Fc γ R y Fc/Clq (Umaha et al., 1999, Nat Biotechnol, 17: 176-180; Davies et al, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al, 2001, J Biol Chem 276: 45539, Radaev et al., 2001, J. Biol Chem 276: 16478-16483; Shields et al., 2002, J Biol. Chem. 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol Chem 278: 3466-3473).

Se proporciona otra estrategia de diseño para generar variantes de Fc de acuerdo con la invención en la que la región Fc se reingeniería para eliminar la dependencia estructural y funcional de la glicosilación. Esta estrategia de diseño implica la optimización de la estructura Fc, estabilidad, solubilidad y/o función Fc (por ejemplo afinidad de Fc para uno o más ligandos Fc) en ausencia del carbohidrato N297. En un enfoque, las posiciones que están expuestas

al disolvente en ausencia de glicosilación son diseñadas de tal manera que son estables, estructuralmente consistentes con la estructura Fc, y no tienen tendencia a agregarse. Los enfoques para optimizar el Fc aglicosilado pueden implicar pero no se limitan a diseñar modificaciones de aminoácidos que aumentan la estabilidad y/o solubilidad de Fc aglicosilada incorporando residuos polares y/o cargados que se dirigen hacia dentro hacia el eje de dímero Cg2-Cg2 y diseñando modificaciones de aminoácidos que realzan directamente la interfase Fc-Fc γ R aglicosilada o la interfase de Fc aglicosilada con algún otro ligando Fc.

Las variantes Fc de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La invención abarca combinar una variante de Fc de la invención con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o nuevas en anticuerpos o fusiones de Fc. Dichas modificaciones pueden estar en los dominios CH1, CH2 o CH3 o una combinación de los mismos. Preferiblemente, las variantes Fc de la invención mejoran la propiedad de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante Fc de la invención se combina con un mutante conocido para unirse a Fc γ RIIIA con una afinidad más alta que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje; la combinación con un mutante de la invención da como resultado un mayor aumento del plegamiento en la afinidad con Fc γ RIIIA.

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

Se desarrolló un ensayo de unión a Fc γ R-Fc para determinar la unión de las moléculas de la invención que comprende regiones Fc variantes a Fc γ R, lo que permitió la detección y cuantificación de la interacción, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor para 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 que tiene una avidéz mejorada para una región Fc, en relación con un Fc γ R no complejado. De acuerdo con la invención, el complejo molecular preferido es un complejo inmune tetramérico, que comprende: (a) la región soluble de Fc γ R (por ejemplo, la región soluble de Fc γ RIIIA, Fc γ RIIA o Fc γ RIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida operativamente al extremo C-terminal de la región soluble de Fc γ R (por ejemplo, la región soluble de Fc γ RIIIA, Fc γ RIIA o Fc γ RIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una relación molar para formar un complejo Fc γ R tetrámero (preferiblemente en una relación molar 5:1). De acuerdo con una realización preferida de la invención, la proteína de fusión es biotinilada enzimáticamente, utilizando, por ejemplo, la enzima *E. coli* Bir A, una biotina ligasa que biotinila específicamente un residuo de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. En una realización específica de la invención, el 85% de la proteína de fusión está biotinilado, según se determina por métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, el ensayo de cambio de estreptavidina. De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, las proteínas Fc γ R solubles biotiniladas se mezclan con SA-PE en una proporción molar 1X SA-PE:5X biotinilada Fc γ R soluble para formar un complejo Fc γ R tetrámero.

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

Los complejos inmunes formados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, pueden usarse para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o sin células.

Como cuestión de 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 de unirse a complejos tetraméricos Fc γ R. Otras formas de complejos moleculares para usar en la determinación de las interacciones Fc-Fc γ R también se contemplan para su uso en los métodos de la invención.

5.2.3 Mutagenesis y construcción de bibliotecas de despiquete de levadura

Las interacciones moleculares entre los receptores Fc y Fc de IgG han sido previamente estudiadas tanto por técnicas estructurales como genéticas. Estos estudios identificaron residuos de aminoácidos que son críticos para la

unión funcional de Fc a diferentes Fc γ R. Ninguno de estos cambios ha demostrado mejorar la eficacia mediada por Fc γ R humana de anticuerpos terapéuticos en modelos animales. No se ha informado de un análisis completo de todos los posibles cambios de aminoácidos en estos residuos u otros residuos potencialmente importantes. La plataforma descrita en este documento tiene la capacidad de construir tantas bibliotecas mutantes con todos los posibles cambios de aminoácidos, bibliotecas de criba usando ensayos funcionales múltiples y finalmente analizar bibliotecas en modelos animales humanizados relevantes.

También se describe la construcción de múltiples bibliotecas basadas tanto en datos genéticos como estructurales conocidos en la técnica o en desarrollo. El método descrito y ejemplificado en el presente documento incorpora la construcción de bibliotecas individuales que contienen mutantes que prueban todos los cambios de 20 aminoácidos entre 3-6 residuos en la región Fc. El conjunto completo de mutaciones se reunirá en todas las posibles combinaciones de mutaciones. El número de mutaciones independientes generadas se basa en el número de sitios que están saturados durante el ensamblaje de la biblioteca (Tabla 9 a continuación). El tamaño de la biblioteca determinará la elección de la criba primaria y por lo tanto la elección del vector para los pasos iniciales de clonación.

Tabla 9: Número de mutantes independientes con base en el número de sitios diana.

Biblioteca	# De residuos	# Mutantes independientes	Criba primaria
Pequeña	3 o menos	8000 máx.	ELISA
Grande	4 - 6	$1.6 \times 10^5 - 6.4 \times 10^7$	Despliegue en superficie

Pueden construirse bibliotecas combinatorias, centrándose en un número limitado de residuos críticos (por ejemplo, 3-6). Usando una biblioteca de IgG1 Fc mutagenizada aleatoriamente y los ensayos de cribado descritos y ejemplificados en la presente variantes de FC se identificarán. En las rondas iniciales, se seleccionarán las mejores 5 mutaciones, basadas tanto en el perfil de unión a FcR como en la actividad funcional. Se necesitarán 20^5 mutantes individuales para cubrir todos los posibles cambios de aminoácidos y sus combinaciones en cinco lugares. Se generará una biblioteca con una cobertura de al menos 10 veces para cada mutante. Además, las regiones se elegirán basándose en la información disponible, por ejemplo, datos de estructura cristalina, diferencias de unión de Fc γ R de isotipo de ratón/humano, datos genéticos y sitios adicionales identificados por mutagénesis.

La mayor desventaja de los actuales protocolos mutagénicos dirigidos a sitios es la producción de poblaciones de sesgo, sobrerrepresentando variaciones en algunas regiones y sub-representando o faltando completamente mutaciones en otras. La presente invención supera este problema mediante la generación de matrices imparciales de mutantes Fc deseables usando una tecnología de construcción génica bien desarrollada para eliminar el sesgo introducido en la construcción de la biblioteca por abordajes basados en PCR tales como la PCR solapada y la PCR invertida. Las distinciones clave del enfoque de la presente invención son: 1) Empleo de una mezcla equimolar de 20 oligos individuales para cada codón dirigido en lugar de cebadores degenerados. De esta manera, cada aminoácido está representado por un solo codón más utilizado, mientras que los cebadores degenerados representan los aminoácidos codificados por más codones sobre los codificados por menos codones. 2) Construcción de mutantes mediante un enfoque de sustitución de la cadena. Esto asegura la introducción imparcial de todos los cambios deseables en el producto final.

Un protocolo de ejemplo comprende las siguientes etapas: 1) oligos fosforilados, que representan cambios deseables en una o varias ubicaciones, todos complementarios a la misma cadena, añadidos a la plantilla junto con un ADN polimerasa deficiente en exonucleasa 5' \rightarrow 3' termoestable, ADN polimerasa y ligasa (figura 25a). 2) se somete a una serie de ciclos de polimerización/ligación suficientes para generar la cantidad deseada de producto. El uso de un ADN polimerasa deficiente en exonucleasa 5' \rightarrow 3' asegura la integridad de la secuencia cebadora y su residuo fosfato, cuando una ligasa termoestable ensambla fragmentos individuales extendidos por cebador en una cadena de cadena sencilla contigua. Los ciclos de reacción pueden continuar hasta la disminución completo de la piscina de oligos sin introducir un sesgo en el producto final (Figura 25b). 3), se convierte en ADN de doble cadena mediante la adición de un cebador específico de gen inverso a la reacción (Figura 25 1c). 4) el producto bicatenario se digiere en los sitios de restricción diseñados al final y se clona en un vector de expresión apropiado (figura 25 1d)

Para asegurar la calidad de la biblioteca, los fragmentos amplificados por PCR se analizarán por electroforesis para determinar la longitud de los productos finales de PCR. La reacción se caracterizará como exitosa si el >99% de los productos de PCR son de la longitud esperada. La biblioteca final se clonará en un vector de expresión. Una fracción de la biblioteca mutante se secuenciará para determinar la tasa de incorporación de codones mutantes. El número de fragmentos secuenciados se basará en el número de sitios diana mutados y la validación de la biblioteca será determinada por la tasa de mutación observada en los sitios objetivo (Tabla 10). La tasa de vector sin insertos debe ser inferior al 2%. La tasa de mutación en los sitios no diana debe ser inferior al 8%. Las bibliotecas que contengan clones con >90% de inserciones correctas nos permitirán mantener cronogramas de selección.

Tabla 10: Tasas esperadas de mutación para las bibliotecas

Residuos direccionados	Tasas de mutación aproximadas para la validación de la biblioteca						
	# De seq. Reacciones	Simple	Doble	triple	Cuant.	Penta.	Hex.
3	20	42%	43%	15%	NA	NA NA	NA NA
4	50	29%	43%	21%	7%		
5	75	18%	35%	32%	11%	4%	NA
6	100	12%	20%	40%	20%	6%	2%

5 En otras formas de realización, la invención comprende PCR superpuesta o invertida para la construcción de bibliotecas. Con el fin de evitar sesgos, se utilizarán cebadores individuales para cada codón en lugar de cebadores degenerativos. Se empleará un esquema de validación similar al divulgado anteriormente.

10 Más preferiblemente, se emplearán protocolos automatizados para la producción de bibliotecas de alto rendimiento. La automatización permite un rendimiento mejorado, una operación a pie y una reducción general del error experimental en tareas que requieren operaciones repetitivas y tediosas. Las capacidades de síntesis de oligo se basan en 2 sintetizadores de ADN Mermade (Bioautomation, Inc.) con una capacidad de salida total de 575 oligos 60mer/12 hrs. El software propietario maneja todos los aspectos del diseño, síntesis y almacenamiento de los oligonucleótidos finales. Se emplearán manipuladores de líquidos robóticos para establecer oligos para la síntesis de mutantes Fc de longitud completa y se establecerán reacciones de ligación para incorporar los Fcs mutantes en vectores de expresión de cadenas pesadas de anticuerpos. Después de la ligación se estima que tomaría 1 FTE ~10 días para disponer los clones de la biblioteca y generar ~8000 minipreps, equivalente a una biblioteca combinatoria saturada en 3 sitios. Después de la transformación bacteriana se utilizará un robot selector de clones Qpix-2 para recoger colonias en 96 placas de pozos profundos. El crecimiento de la cultura se hará utilizando un agitador de levitación magnética, capaz de incubar 12 placas y dando como resultado un crecimiento denso en 12-16 horas a 37°C. Se utilizará un robot miniprep Qiagen para realizar preparaciones de ADN a razón de 4 placas de 96 pozos en 2.5 hrs. Mediante la superposición de tareas 5 tales bibliotecas podrían construirse en 9 meses con 1 FTE

20 La maduración de afinidad requiere el ensamblaje de un nuevo conjunto de combinaciones de mutaciones, a partir de un grupo mutante preseleccionado o miembros de una familia de genes, que puede ser enriquecido mediante un protocolo de selección. El proceso se repite varias veces hasta que se consigue el aislamiento de un mutante con el fenotipo deseado. La desventaja del enfoque enzimático actual, la mezcla de ADN, para realizar este proceso es un sesgo que puede ser introducido debido a sitios específicos dentro del gen que son puntos calientes para nucleasas, dominancia de mutantes específicos en la piscina final reensamblada y pérdida de parte del original mutantes en la piscina final. Con el fin de superar esta deficiencia se utilizará una tecnología de generación de genes (BAG) para generar una biblioteca altamente compleja de mutantes Fc que contienen cambios aleatorios de aminoácidos en todas las localizaciones potenciales que pueden ser importantes para la unión de los receptores. Se utilizarán conjuntos de oligos degenerados que cubren regiones específicas de la IgG Fc (véase la figura 26).

30 Los oligos serán ~30 nt y se generarán oligos degenerados sintetizados para cambiar uno (4 oligos) o dos AA (8 oligos). Los oligos están diseñados para superponerse sin espacios. Se tomarán ~200 oligos para acomodar todos los únicos cambios de AA y ~2000 para cambiar dos AA por oligonucleótido. Todos los oligos de 2000+ se utilizarán individualmente y en combinaciones para generar matrices de mutantes Fc usando el protocolo descrito anteriormente (A.20). Utilizaremos un programa de asignación al azar escrito en casa y un manipulador de líquidos robótico para combinar combinaciones seleccionadas de oligos mutantes y de tipo salvaje. Las bibliotecas grandes se clonarán en vectores que permitirán el cribado usando la visualización de la superficie de la levadura. Este enfoque utiliza una selección de perlas magnéticas seguida de citometría de flujo y se ha aplicado con éxito a bibliotecas con una complejidad >10⁹ (Feldhaus et al., 2003, Nat. Biotech, 21(2): 163-170). Esto limita el número de sitios para probar en cualquier grupo a 7, resultando en ~1.3 x 10⁹ posibles mutaciones/reserva.

40 Para asegurar la calidad de la biblioteca, los fragmentos amplificados por PCR 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 biblioteca mutante se secuenciará para determinar la tasa de incorporación de codones mutantes. El número de fragmentos secuenciados se basará en el

número de sitios diana mutados y la validación de la biblioteca será determinada por la tasa de mutación observada en los sitios objetivo (Tabla 10). La tasa de vectores sin insertos debe ser inferior al 2%. La tasa de mutación en los sitios no diana debe ser inferior al 8%.

5 La capacidad para generar el nivel deseado de eficacia de la mutagénesis mediante este enfoque se determinará por secuenciación de un subconjunto de clones. La alternativa al BAG estará utilizando un protocolo de "mezcla de ADN ". Esto requiere la agrupación de todos los mutantes, simple, doble, triple, etc. Después de la preparación del ADN, las regiones Fc se amplificarán por PCR usando cebadores de acompañamiento que amplifiquen selectivamente la región mutada del Fc, -700 pb. Los nuevos mutantes se construyen modificando de nuevo mutaciones en el Fc mediante el tratamiento selADN del ADN amplificado y aislando fragmentos de 150-200 pb (véase, por ejemplo, Stemmer et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 10747 -51). Los fragmentos serán religados, amplificados por PCR con cebadores anidados y clonados en el vector de presentación de superficie de levadura, pYD1. La biblioteca recombinada se volverá a seleccionar en la criba de visualización de Fc de levadura tal como se describe y ejemplifica aquí.

15 Las bibliotecas de BAG utilizarán la mayor parte del mismo equipo que la biblioteca combinatoria. Sin embargo, la clonación será en un vector adecuado para la visualización de la superficie de la levadura y no requerirá la disposición de clones individuales como despliegue en superficie de la levadura se empleará inicialmente para el enriquecimiento de bibliotecas grandes. Después del nivel apropiado de enriquecimiento, se dispondrán clones individuales.

20 Se produce una biblioteca inicial de moléculas que comprende regiones Fc variantes usando cualquier técnica de mutagénesis basada en el azar conocida en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que pueden obtenerse variantes de la secuencia de aminoácidos de las regiones Fc mediante cualquier técnica de mutagénesis conocida por los expertos en la técnica. Algunas de estas técnicas se describen en resumen aquí, 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 variantes se preparan mediante PCR propensa a errores como se ejemplifica en el Ejemplo 6, infra (véase Leung et al., 1989, Technique, 1:11). Se prefiere especialmente tener velocidades de error de 2-3 pb/Kb para usar en los métodos de la invención. En una realización, utilizando la PCR propensa a error se obtiene una frecuencia de mutación de 2-3 mutaciones/kb.

30 La mutagénesis se puede realizar 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) por modificar. La mutagénesis específica del sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar una secuencia estable en ambos lados de la unión de supresión que se está atravesando. Típicamente, se prefiere un cebador de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 nucleótidos o más de longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o más residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera. Un número de dichos cebadores que introducen una diversidad de mutaciones diferentes en una o más posiciones se pueden utilizar para generar una biblioteca de mutantes.

40 La técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en la técnica, como se ejemplifica por varias publicaciones (véase, por ejemplo, Kunkel et al., Methods Enzymol., 154: 367-82, 1987). En general, la mutagénesis dirigida se realiza mediante la obtención inicial de un vector monocatenario o la fusión de dos cadenas de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador oligonucleotídico que lleva la secuencia mutada deseada, generalmente de forma sintética. Este cebador se refusiona a continuación con el vector de cadena sencilla y se somete a enzimas polimerizadores de ADN tales como polimerasa de ADN T7, con el fin de completar la síntesis de la cadena portadora de mutación. De este modo, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena lleva la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza entonces para transformar o transfectar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada. Como se apreciará, la técnica emplea típicamente un vector de fago que existe tanto en una forma de cadena sencilla como de doble cadena. Los vectores típicos útiles en mutagénesis dirigida incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos bicatenarios también se emplean rutinariamente en la mutagénesis dirigida a un sitio que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

55 Alternativamente, puede utilizarse el uso de PCRTM con enzimas termoestables disponibles comercialmente tales como ADN polimerasa Taq para incorporar un cebador oligonucleotídico mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de expresión o de clonación apropiado. Ver, por ejemplo, Tomic y col., Nucleic Acids Res., 18(6): 1656, 1987, y Upender et al., Biotechniques, 18(1): 29-30, 32, 1995, para procedimientos de mutagénesis mediada por PCRTM. PCRTM que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable también se puede usar para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de clonación o expresión apropiado

(véase por ejemplo Michael, *Biotechniques*, 16 (3): 410-2, 1994).

Otro método para preparar variantes para uso en la invención, es la mutagénesis de casete basada en la técnica descrita por Wells et al. (1985, *Gene*, 34: 315). El material de partida es el plásmido que comprende el ADN deseado que codifica la proteína a ser mutada (por ejemplo, el ADN que codifica un polipéptido que comprende una región Fc). Se identifican el(los) codón(es) en la secuencia de ADN a ser mutada; debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del sitio o sitios de mutaciones identificados. Si no sale tal sitio de restricción, puede ser generado por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. Después de que los sitios de restricción se han introducido en el plásmido, el plásmido se corta en estos sitios y se linealiza. Un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación se sintetiza utilizando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. El oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete está diseñado para tener extremos 3' y 5' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de modo que puede ser ligado directamente al plásmido.

Se pueden usar otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para producir variantes de secuencia de la región Fc de un anticuerpo o polipéptidos que comprenden una región Fc. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican la secuencia de aminoácidos del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento del mismo pueden tratarse con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

Una vez que se produce una biblioteca mutante de acuerdo con los métodos descritos, la biblioteca mutagenizada se transforma en una cepa de levadura, preferiblemente EBY100 (Invitrogen), MATa *ura3-52 trp1 leu2Δl his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL::GAL-AGA1* usando un protocolo de transformación de acetato de litio estándar conocido por los expertos en la técnica (ref).

Un experto en la técnica apreciará que una vez que las moléculas de la invención con las propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácidos, modificación que mejora la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable, que comprende una región Fc de tipo salvaje (Véase la sección 5.1 y la tabla 2) de acuerdo con los métodos de la invención, pueden diseñarse otras moléculas (es decir, anticuerpos terapéuticos) usando ADN recombinante estándar y cualquier técnica de mutagénesis conocida, como se describe en esta sección para producir moléculas manipuladas que llevan los sitios de mutación identificados.

5.2.4 Despliegue en superficie de levaduras

El método preferido para cribar e identificar moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades de FcγR alteradas (es decir, afinidad de FcγRIIIA mejorada y/o FcγRIIA) es la tecnología de despliegue en superficie de levaduras (para revisión véase Boder and Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444), que aborda la deficiencia en la técnica anterior para el cribado de interacciones de unión de proteínas extracelulares modificadas después de la traducción. Específicamente, despliegue en superficie de levaduras es un método genético mediante el cual los polipéptidos que comprenden mutantes Fc se expresan en la pared celular de levadura en una forma accesible para interactuar con FcγR. Despliegue en superficie de levadura de los polipéptidos que contienen Fc mutante de la invención se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6.423.538; 6,114,147; y 6,300,065. Véase Boder et al., 1997 *Nat. Biotechnol.*, 15: 553-7; Boder et al., 1998 *Biotechnol. Prog.*, 14: 55-62; Boder et al., 2000 *Methods Enzymol.*, 328: 430-44; Boder et al., 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97: 10701-5; Shusta et al., 1998 *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16: 773-7; Shusta et al., 1999 *J. Mol. Biol.*, 292: 949-56; Shusta et al., 1999 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 117-22; Shusta et al., 2000 *Nat. Biotechnol.*, 18: 754-9; Wittrup et al., 1994, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 745: 321-30; Wittrup et al., 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.

El despliegue en superficie de levadura se usará para enriquecer bibliotecas que contienen $>10^7$ clones independientes. Este enfoque proporcionará la capacidad de enriquecer grandes bibliotecas >20 veces en una sola clase. Las bibliotecas mutantes Fc con >10.000 mutantes independientes (4 o más sitios) serán clonadas en los vectores apropiados para la visualización de la superficie de la levadura y enriquecidas por clasificación FACS hasta que <8000 mutantes puedan ser probados por otros ensayos bioquímicos y funcionales como se describe a continuación.

La invención proporciona métodos para construir una biblioteca de mutantes Fc en levaduras para mostrar moléculas que comprenden regiones Fc, que han sido mutadas como se describe en la Sección 5.2.2. Preferentemente, las bibliotecas de mutantes Fc para uso en los métodos de la invención contienen al menos 10^7 células, hasta 10^9 células. Un método de ejemplo para construir una biblioteca Fc para uso en los métodos de la invención comprende lo siguiente: los ácidos nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc se clonan en el sitio de clonación múltiple de un vector derivado de un vector de replicación de levadura, por ejemplo, pCT302; de manera que los ácidos nucleicos codificantes de Fc se expresan bajo el control del promotor inducible por galactosa GAL1 y marco interno con una secuencia de nucleótidos que codifica Aga2p, la proteína de pared celular de aglutinina de acoplamiento. En una realización preferida, los ácidos nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc se clonan en C-terminal a la región codificante de Aga2p, de manera que se codifica una

proteína de fusión Aga2p de región Fc. Una proteína de fusión que comprende la proteína Aga2p y los polipéptidos que comprenden regiones Fc serán segregadas extracelularmente y presentadas en la pared celular a través de la unión disulfuro a la proteína Aga1p, una proteína integral de pared celular, usando la construcción preferida de la invención. En una realización alternativa, las construcciones pueden comprender además secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítipo. Puede utilizarse cualquier secuencia codificante de nucleótidos marcadora de epítipo conocida por los expertos en la técnica 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 FACS, microscopía de fluorescencia confocal o métodos de inmunotinción estándar, todos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, la presencia de las proteínas de fusión Fc de la invención en la superficie de la célula de levadura se detectan utilizando anticuerpos monoclonales específicos de Fc (específicos para CH3), incluyendo pero sin limitarse a anticuerpo monoclonal específico de Fc IgG1, HP6017 (Sigma), JL512 (Immunotech), y cualquier anticuerpo descrito en Partridge et al., 1986, *Molecular Immunology*, 23(12): 1365-72. En otro caso, la presencia de las proteínas de fusión Fc de la invención se detecta mediante marcaje inmunofluorescente con marcadores de epítipo usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Es particularmente útil en los métodos utilizar secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítipo para flanquear los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión Fc, como un control interno, para detectar si las proteínas de fusión se muestran en la pared celular en una forma parcialmente proteolizada.

5.2.5 Criba de bibliotecas de despliegue en levaduras

El cribado de las bibliotecas de despliegue en levaduras puede realizarse usando ensayos basados en inmunología incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos basados en células, ensayos basados en soluciones y ensayos basados en fase sólida.

En algunos casos, se pueden identificar mutantes Fc con afinidades de Fc γ R alteradas utilizando métodos de maduración por afinidad que son conocidos por los expertos en la técnica y abarcados en el presente documento. En pocas palabras, la maduración por afinidad crea alelos nuevos al recombinar aleatoriamente mutaciones individuales presentes en una biblioteca mutante, véase, por ejemplo, Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Stemmer et al., 1994 *Nature*, 370: 389-91. Se ha utilizado con éxito para aumentar la afinidad de anticuerpos, receptores de células T y otras proteínas. Pueden usarse mutaciones que muestran una unión aumentada de Fc γ R como una línea de base para construir nuevas bibliotecas mutantes con fenotipos mejorados. Usando los métodos, puede seleccionarse una población de mutantes Fc de IgG1 enriquecidos por la superficie de levadura para aumentar la fijación a un Fc γ R, por ejemplo, Fc γ R111A. Después de la preparación del ADN, las regiones Fc pueden amplificarse por PCR utilizando cebadores flanqueantes que amplifican selectivamente la región mutada de la Fc, que es de aproximadamente -700 pb usando métodos conocidos por un experto en la técnica y ejemplificados o revelados en el presente documento. Los nuevos mutantes se pueden construir por medio de la reorganización de mutaciones en la región Fc, por ejemplo, mediante el tratamiento con *SeI*ADN del ADN amplificado y el aislamiento de fragmentos usando métodos tales como los descritos por Stemmer et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1.0747-51.

Los fragmentos pueden entonces ser religados, amplificados por PCR con cebadores anidados y clonados en el vector de despliegue en levaduras, por ejemplo, pYD1 usando métodos conocidos por un experto en la técnica. La biblioteca recombinada se puede volver a seleccionar en la criba de despliegue de Fc de levadura. A medida que el K_D disminuye, por debajo de 10 nM, pueden establecerse condiciones para permitir mayores aumentos de afinidad basados en la reducción de la velocidad de desconexión del ligando Fc γ R111A del receptor Fc usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en Boder et al., 1998, *Biotechnol. Prog.* 14: 55-62.

Se puede establecer una criba cinética marcando las células que muestran Fc a saturación con un ligando marcado, por ejemplo, un ligando fluorescente seguido de incubación con un exceso de ligando no marcado durante un período predeterminado. Después de la terminación de la reacción por la adición de regulador en exceso (por ejemplo, IX PBS, 0.5 mg/ml de BSA) las células serán analizadas por FACS y los portales de clasificación establecidos para la selección. Después de cada ronda de enriquecimiento mutantes individuales se pueden probar para aumentar el doble en la afinidad y secuenciado por la diversidad. El proceso de recombinación *in vitro* puede repetirse. En algunas formas de realización, el *in vitro* se repite al menos 3 veces.

La selección de las variantes Fc de la invención puede realizarse usando cualquier Fc γ R incluyendo, pero sin limitarse a, variantes polimórficas de Fc γ R. En algunos casos, la selección de las variantes Fc se realiza usando una variante polimórfica de Fc γ R111A que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otros casos, la selección de las variantes Fc se realiza usando una variante polimórfica de Fc γ R111A que contiene una valina en la posición 158. Fc γ R111A 158V muestra una mayor afinidad por IgG1 que 158F y una actividad incrementada de ADCC (véase, por ejemplo, Koene et al., 1997, *Blood*, 90: 1109-14, Wu et al., 1997, *J. Clin. Invest.* 100: 1059-70); este residuo interactúa directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como se ha demostrado recientemente mediante estudios de cocristalización IgG1-Fc γ R111A, véase, por ejemplo, Sonderman et al., 2000, *Nature*, 100: 1059-70.

Los estudios han demostrado que en algunos casos los anticuerpos terapéuticos tienen una eficacia mejorada en

pacientes homocigotos Fc γ R11A-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos Fc γ R11A 158V en comparación con pacientes homocigotos Fc γ R11A 158F (véase, por ejemplo, Cartron et al., 2002 Blood, 99(3): 754-8). Aunque no se pretende unirse a un mecanismo de acción particular, la selección de variantes Fc de la invención con el alotipo Fc γ R11A 158F puede proporcionar variantes que una vez diseñadas en anticuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigóticos Fc γ R11A 158F.

Las bibliotecas de levadura pueden seleccionarse basándose en la disminución de Fc γ R11B y en la selección de Fc γ R11A de modo que se seleccionen mutantes Fc que no sólo tengan una afinidad mejorada para Fc γ R11A sino que también tengan una afinidad reducida para Fc γ R11B. Las bibliotecas de levaduras pueden enriquecerse para los clones que tienen una afinidad reducida para Fc γ R11B por métodos de disminución secuencial, por ejemplo, incubando la biblioteca de levaduras con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ R11B. La disminución de Fc γ R11B se lleva a cabo preferiblemente secuencialmente de manera que la biblioteca se enriquezca en clones que tienen una afinidad reducida para Fc γ R11B. En algunos casos, la etapa de disminución de Fc γ R11B da como resultado una población de células de modo que sólo el 30%, preferiblemente sólo el 10%, más preferiblemente sólo el 5%, lo más preferiblemente menos del 1% se unen a Fc γ R11B. En algunos casos, la disminución de Fc γ R11B se realiza en al menos 3 ciclos, al menos 4 ciclos, al menos 6 ciclos. La etapa de disminución de Fc γ R11B se combina preferiblemente con una etapa de selección de Fc γ R11A, por ejemplo utilizando clasificación FACS de modo que se seleccionen variantes Fc con una afinidad mejorada para Fc γ R11A.

5.2.5.1 Ensayos FACS; ensayos en fase sólida y ensayos de base inmunológica

También se describe la caracterización de las proteínas de fusión Fc mutantes que se despliegan en la pared celular de la superficie de la levadura, de acuerdo con los métodos descritos en la sección 5.2.3. Un método selecciona las proteínas de fusión Fc mutantes con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a Fc γ R11A y/o Fc γ R11B con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R11A y/o Fc γ R11B. En otro caso, un método para seleccionar proteínas de fusión mutantes Fc con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión mutante Fc para unirse a Fc γ R11A y/o Fc γ R11B con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R11A y/o Fc γ R11B y adicionalmente a la capacidad de la proteína de fusión mutante Fc para unirse a Fc γ R11B con una afinidad más baja que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R11B. Un experto en la materia apreciará que los métodos pueden usarse para identificar y seleccionar cualquier mutación en las regiones Fc de moléculas, con cualquier característica de unión deseada.

Las células de levadura que muestran las proteínas de fusión de Fc mutantes pueden ser seleccionadas y caracterizadas por cualquier ensayo bioquímico o inmunológico conocido por los expertos en la técnica para evaluar las interacciones de unión.

Preferentemente, se utiliza la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, para cribar las proteínas de fusión mutantes de Fc mostradas en la superficie de la célula de levadura para unir Fc γ R11A, preferiblemente Fc γ R11A complejo tetramérico, u opcionalmente Fc γ R11B. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente un gran número de células individuales que contienen insertos de biblioteca (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995). Además, se pueden variar los parámetros específicos utilizados para la optimización que incluyen, pero no se limitan a, concentración de ligando (es decir, complejo tetráctico Fc γ R11A), tiempo de competición cinética o rigurosidad FACS para seleccionar las células que muestran proteínas de fusión Fc con propiedades de unión específicas, por ejemplo, una mayor afinidad para Fc γ R11A en comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 and Company y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

Las células de levadura pueden analizarse por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En los casos más preferidos, el análisis FACS de las células de levadura se realiza de una manera iterativa, al menos dos veces, al menos tres veces, o al menos 5 veces. Entre cada ronda de selección, las células se vuelven a generar y se inducen de modo que las regiones Fc se muestran en el número máximo de superficies de células de levadura. A pesar de no pretender estar limitado por un modo de acción particular, este proceso iterativo ayuda a enriquecer la población de las células con un fenotipo particular, por ejemplo, alta unión a Fc γ R11A.

En algunos casos, el cribado para las variantes Fc de la invención comprende un proceso de selección que tiene múltiples rondas de cribado, por ejemplo, al menos dos rondas de cribado. En una realización, el cribado para las variantes de Fc que tienen una afinidad mejorada para Fc γ R11A puede comprender las siguientes etapas: en la

primera ronda de cribado, una biblioteca de células de levadura, por ejemplo, una biblioteca ingenua de 10^7 células es enriquecida por FACS, preferiblemente de una manera iterativa, usando por ejemplo Fc γ RIIIA tetramérico marcado para seleccionar variantes de Fc que tienen una afinidad mejorada para Fc γ RIIIA; la región Fc variante que se selecciona con el fenotipo deseado, por ejemplo, unión mejorada a Fc γ RIIIA, se introduce a continuación en un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo manipulado se ensaya usando un tamiz secundario, por ejemplo, ELISA para la unión a un Fc γ R. En la segunda ronda de cribado, se puede generar una única biblioteca de mutación basada en la primera criba, de manera que la región Fc alberga la variante que muestra la afinidad mejorada para Fc γ RIIIA; y enriquecido por FACS utilizando, por ejemplo, Fc γ RIIA monomérico marcado tanto en la presencia como en ausencia de receptor no marcado; y la región Fc variante se introduce entonces en un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo manipulado se ensaya usando una criba secundaria, por ejemplo, ELISA para la unión a un Fc γ R. En algunas realizaciones, la criba secundaria puede comprender además la caracterización de los anticuerpos que comprenden variantes Fc en un ensayo basado en ADCC o BIAcore utilizando métodos divulgados en el presente documento

La divulgación proporciona el cribado FACS de la biblioteca de levadura mutante bajo condiciones de equilibrio o cinética. Cuando se realiza el cribado en condiciones de equilibrio, se incuba un exceso de la biblioteca de levaduras que contiene mutantes Fc con Fc γ RIIIA, preferiblemente se marca Fc γ RIIIA a una concentración de 5-10 veces por debajo del Kd, durante al menos una hora para permitir la unión de Fc mutantes a Fc γ RIIIA bajo condiciones de equilibrio. Cuando el cribado se realiza bajo condiciones cinéticas, la biblioteca de levadura mutante se incuba con Fc γ RIIIA marcado; las células se incuban a continuación con Fc γ RIIIA equimolar no marcado durante un tiempo preseleccionado, y el Fc γ RIIIA unido se monitoriza continuación.

Un método de ejemplo para analizar las células de levadura que expresan proteínas de fusión de Fc mutantes con FACS está conteniendo las células con complejo Fc γ RIIIA tetramérico que ha sido marcado con un marcador fluorescente tal como PE y un anticuerpo anti-Fc, tal como F(ab) $_2$ anti-Fc que ha sido marcado con fluorescencia. Las mediciones de fluorescencia de una biblioteca de levaduras producida de acuerdo con los métodos de la invención implican preferentemente comparaciones con controles; por ejemplo, células de levadura que carecen de las moléculas codificadoras de inserto que comprenden una región Fc (control negativo). El clasificador de flujo tiene la capacidad no sólo de medir señales de fluorescencia en las células a una velocidad rápida, sino también de recoger células que tienen propiedades fluorescentes especificadas. Esta característica se puede emplear para enriquecer la población inicial de la biblioteca para las células que expresan proteínas de fusión Fc con características de unión específicas, por ejemplo, mayor afinidad para Fc γ RIIIA en comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, las células de levadura se analizan mediante FACS y se establecen portales de clasificación para seleccionar células que muestran la mayor afinidad por Fc γ RIIIA en relación con la cantidad de expresión de Fc en la superficie de la célula de levadura. Pueden establecerse cuatro tipos consecutivos, en los que los portales para cada tipo sucesivo son 5.5%, 1%, 0.2% y 0.1%. Se prefiere que la biblioteca de despliegue en levaduras formada de acuerdo con los métodos de la invención sea sobremuestreada por lo menos 10 veces para mejorar la probabilidad de aislar clones raros (por ejemplo, analizar $\sim 10^8$ células de una biblioteca de 10^7 clones). Alternativamente, se establecen tipos 2-5 para seleccionar células del fenotipo deseado. Los portales de clasificación pueden establecerse empíricamente por un experto en la técnica.

En otros casos, las proteínas de fusión de Fc mutantes exhibidas 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, preferiblemente de una manera elevada a través de la unión a un Fc γ R, por ejemplo, Fc γ RIIIA. En un caso, se pueden usar ensayos de perlas magnéticas para identificar mutantes con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y/o afinidad reducida para Fc γ RIIB. Un ensayo de ejemplo para identificar mutantes con afinidad mejorada para Fc γ RIIIA y afinidad reducida para Fc γ RIIB puede comprender la selección de mutantes mediante una disminución secuencial de fase sólida usando perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIB seguido por selección con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIIA. Por ejemplo, un ensayo puede comprender las siguientes etapas: incubar la biblioteca de células de levadura generadas de acuerdo con los métodos de la invención con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIB; separar las células de levadura unidas a perlas de la fracción no unida mediante la colocación de la mezcla en un campo magnético, la eliminación de las células de levadura no unidas y su colocación en un medio fresco; unir las células de levadura a perlas recubiertas con Fc γ RIIIA, separar las células de levadura unidas a perlas de la fracción no unida mediante la colocación de la mezcla en un campo magnético, la eliminación de las células de levadura no unidas; eliminación de las células unidas por vórtice riguroso; cultivar las células recuperadas en medios que contienen glucosa; reinducción en medios selectivos que contienen galactosa. El proceso de selección se repite al menos una vez. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplifican a continuación usando metodologías comunes conocidas en la técnica, por ejemplo PCR, y se introducen en un anticuerpo por métodos ya descritos para una caracterización adicional.

En un caso alternativo, se utiliza un sistema sin base de levadura para caracterizar las propiedades de unión de las moléculas de la invención. Un sistema de ejemplo para caracterizar 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, en el que 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 de células huésped de mamífero (es decir, línea de células de

rión humano 293H), y la inmunoglobulina recombinante resultante se analiza para su unión a Fc γ R usando cualquier ensayo estándar conocido por los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitado a ELISA y FACS.

Las moléculas de la presente invención (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas) pueden caracterizarse de diversas maneras. En particular, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc modificadas pueden ser ensayadas en cuanto a la capacidad de unirse inmuno-específicamente a un ligando, por ejemplo, complejo tetramérico Fc γ R1IIIA. Tal ensayo puede realizarse en solución (por ejemplo, Houghten, *Bio/Techniques*, 13: 412-421, 1992), sobre perlas (Lam, *Nature*, 354: 82-84, 1991), en chips (Fodor, *Nature*, 364: 555-556, 1993) sobre bacterias (Patente de los Estados Unidos No. 5,223,409), sobre esporas (Patentes de los Estados Unidos No. 5,571,698, 5,403,484 y 5,223,409) sobre plásmidos (Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1865-1869, 1992) o en fagos (Scott and Smith, *Science*, 249: 386-390, 1990, Devlin, *Science*, 249: 404-406, 1990; Cwirla et al., *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, Fc γ R1IIIA, pueden ser ensayadas para determinar su especificidad y afinidad para el ligando.

Las moléculas de la invención que han sido modificadas genéticamente para comprender regiones Fc modificadas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) o que han sido identificadas en el sistema de despliegue en levaduras para que tengan el fenotipo deseado (véase la Sección 5.1) pueden ensayarse para la unión inmuno-específica a un antígeno (por ejemplo, antígeno de cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, Fc γ R) por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmuno-específica y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitación con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar sólo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión de las moléculas de la presente invención que comprende regiones Fc modificadas a un ligando, por ejemplo, el complejo tetramérico Fc γ R y la velocidad de desviación de la interacción se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un ligando marcado, tal como Fc γ R tetramérico (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con una molécula de interés (por ejemplo, moléculas de la presente invención que comprenden regiones Fc modificadas) en presencia de cantidades crecientes de ligando no marcado, tal como Fc γ R tetramérico, y la detección de la molécula unida al ligando marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención para el ligando y las velocidades de liberación de unión se puede determinar a partir de los datos de saturación mediante análisis de Scatchard.

En un caso, el análisis cinético de BIAcore se usa para determinar las velocidades de unión y de desconexión de moléculas de la presente invención a un ligando tal como Fc γ R. El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un ligando de virutas con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden regiones Fc modificadas) en su superficie.

5.2.6 Secuenciación de mutantes

Cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica puede usarse para secuenciar directamente las moléculas de la invención que comprenden regiones variantes Fc. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim and Gilbert (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560, 1977) o Sanger (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463, 1977). También se contempla que puede utilizarse cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados (*Bio/Techniques*, 19: 448, 1995), incluyendo la secuenciación mediante espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 94/16101, Cohen et al., *Adv. Chromatogr.*, 36: 127-162, 1996, y Griffin et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38: 147-159, 1993).

5.2.7 Ensayos funcionales de moléculas con regiones Fc variantes

Las moléculas de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante identificada por la tecnología de despliegue en levaduras descrita anteriormente o anticuerpos monoclonales terapéuticos diseñados de acuerdo con la invención) se pueden caracterizar usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar la función de la célula efectora de las moléculas. En particular, las moléculas de la invención pueden caracterizarse para la función de células efectoras mediadas por Fc γ R. Ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ser ensayadas incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento. Se puede usar cualquier ensayo celular o sin células conocido por los expertos en la técnica para determinar la actividad de la función de las células efectoras (para ensayos de células efectoras, véase Perussia et al., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini et al., 1998 *Experientia*, 44(10): 841-8, Lehmann et

al., 2000 J. Immunol. Methods, 243 (1-2): 229-42, Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64, Munn et al., 1990 J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid et al., 2002 Scand. J. Immunol., 55: 70-81, Ding et al., 1998, Immunity 8: 403-411).

5 Las moléculas de la invención se pueden ensayar para la fagocitosis mediada por Fc γ R en monocitos humanos. Alternativamente, la fagocitosis mediada por Fc γ R de las moléculas de la invención puede ensayarse en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Brown EJ., 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-164).

10 La función de las moléculas de la invención puede caracterizarse por la medición de la capacidad de las células THP-1 para fagocitar los glóbulos rojos ovinos opsonizados con IgG fluoresceinados (SRBC) mediante procedimientos descritos previamente (Tridandapani et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo de ejemplo para medir la fagocitosis de las moléculas de la invención que comprende regiones Fc variantes con afinidades mejoradas para Fc γ RIIIa, comprende: tratar células THP-1 con una molécula de la invención o con un anticuerpo de control que no se una a Fc γ RIIIa, comparando los niveles de actividad de dichas células, donde una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, la actividad de rosado (el número de células THP-1 que unen SRBC recubierto con IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unido a células THP-1) y velocidad fagocítica) indicaría la funcionalidad de la molécula de la invención. Un experto en la técnica puede apreciar que este ensayo de ejemplo puede usarse para analizar cualquiera de las moléculas identificadas mediante los métodos descritos.

20 Otro ensayo de ejemplo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpo (ADCP) que puede comprender lo siguiente: revestir una biopartícula diana tal como FITC (Molecular Probes) marcado con *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo salvaje, un anticuerpo contra la fluoresceína (véase Bedzyk et al., 1989, J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para ADCP dependiente de Fc γ R; o (ii) un anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que elimina la unión a Fc γ RIII, como control de fondo para las regiones Fc γ R variantes de ADCP (iii) las regiones Fc de la variante que llevan el anticuerpo 4-4-20 identificadas por los métodos descritos y producidos como se ejemplifica en el Ejemplo 6.6; y formar la partícula opsonizada; la adición de cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a células efectoras de THP-1 (una línea celular monocítica disponible de ATCC) en una relación de 60:1 para permitir la fagocitosis mediada por Fc γ R; preferiblemente incubando las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37°C durante 1.5 horas; añadir azul de tripano después de la incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 minutos) a las células para extinguir la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; transferir células a un regulador FACS (por ejemplo, 0.1%, BSA en PBS, 0.1%, azida de sodio), analizar la fluorescencia de las células THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 utilizadas en el ensayo se analizan mediante FACS para la expresión de Fc γ R en la superficie celular. Las células THP-1 expresan CD32A y CD64. CD64 es un Fc γ R de alta afinidad que se bloquea en la realización del ensayo ADCP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 se bloquean preferiblemente con 100 μ g/mL de IgG1 soluble o suero humano al 10%. Para analizar el grado de ADCP, el portal se fija preferiblemente en células THP-1 y se mide la intensidad mediana de fluorescencia. La actividad de ADCP para mutantes individuales se calcula y se informa como un valor normalizado para el tipo salvaje chMab 4-4-20 obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a células THP-1 de tal manera que la relación de las partículas opsonizadas a las células THP-1 es de 30:1 o 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo de ADCP se lleva a cabo con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para servir como actividad de ADCP independiente de Fc γ R), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo salvaje (para servir como actividad ADCP dependiente de Fc γ R), células *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (para servir como control de fondo para la actividad de ADCP dependiente de Fc γ R).

50 Las moléculas de la invención se pueden ensayar para la actividad de ADCC mediada por Fc γ R en células efectoras, por ejemplo, células asesinas naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Perussia et al., 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92). Un ensayo de ejemplo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar las células diana con [⁵¹Cr] Na₂CrO₄ (esta molécula permeable a la membrana celular se usa comúnmente para el marcaje ya que se une a proteínas citoplásmicas y aunque se libera espontáneamente de las células con cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de células diana); opsonizar las células diana con las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes; combinar las células diana radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación a una proporción apropiada de células diana a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37°C; recolección de sobrenadantes; y el análisis de la radioactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención puede entonces determinarse, por ejemplo utilizando la siguiente fórmula: % lisis = (cpm experimental - cpm de pérdida objetivo)/(lisis de detergente cpm - cpm de pérdida objetivo) x 100%. Alternativamente, % de 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 variando la relación objetivo: célula efectora o concentración de anticuerpo.

60

Las moléculas de la invención pueden ser: caracterizadas por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) véase, por ejemplo, Ding et al., *Immunity*, 1998, 8: 403-11.

Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente a partir de sangre humana normal, usando métodos estándar conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos de la invención expresan diferentes receptores de activación de Fc γ R. Se describen células efectoras, THP-1, que expresan Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana total que expresan tanto Fc γ RIIIA como Fc γ RIIB, para determinar si los mutantes de anticuerpo Fc muestran un aumento de actividad ADCC y fagocitosis con respecto a anticuerpos IgG1 de tipo salvaje.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad Fc γ RI y el receptor de baja afinidad Fc γ RIIA (Fleit et al., 1991, *J. Leuk. Biol.* 49: 556). Las células THP-1 no expresan constitutivamente Fc γ RIIA o Fc γ RIIB. La estimulación de estas células con citoquinas efectúa el patrón de expresión de FcR (Pricop et al., 2000 *J. Immunol.*, 166: 531-7). El crecimiento de células THP-1 en presencia de la citoquina IL4 induce la expresión de Fc γ RIIB y provoca una reducción en la expresión de Fc γ RIIA y Fc γ RI. La expresión de Fc γ RIIB también puede potenciarse por el aumento de la densidad celular (Tridandapani et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 5082-9). Por el contrario, se ha informado de que IFN γ puede conducir a la expresión de Fc γ RIIIA (Pearse et al., 1993 *PNAS USA* 90: 4314-8). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular puede determinarse mediante FACS usando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. La citoquina inducida por la expresión de Fc γ R en la superficie de la célula proporciona un sistema para probar tanto la activación y la inhibición en presencia de Fc γ RIIB. Si las células THP-1 son incapaces de expresar el Fc γ RIIB, la invención también abarca otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian terminalmente en macrófagos en presencia de IFN γ y TNF (Koren et al., 1979, *Nature* 279: 328-331).

La muerte de células tumorales dependientes de Fc γ R está mediada por células de macrófagos y NK en modelos de tumores de ratón (Clynes et al., 1998, *PNAS USA* 95: 652-656).

Los monocitos elutriados de donantes pueden usarse como células efectoras para analizar el rendimiento de los mutantes Fc para activar la citotoxicidad celular de las células diana en los ensayos tanto de fagocitosis como de ADCC. Los patrones de expresión de Fc γ RI, Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de Fc γ R de monocitos elutriados congelados, monocitos elutriados frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10% y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano puede determinarse usando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden teñir con anticuerpos Fc γ R específicos y analizar por FACS para determinar perfiles FcR. Las condiciones que mejor imitan macrófagos *in vivo* Fc γ R expresión se utiliza entonces para los métodos.

En algunos métodos pueden usarse células de ratón, especialmente cuando no se pueden obtener células humanas con perfiles Fc γ R adecuados. En algunos casos, la invención abarca la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (ATCC), que puede transfectarse con Fc γ RIIIA humano y transfectantes estables aislados usando métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph et al., *J. Immunol.* 119: 950-4). Los transfectantes se pueden cuantificar para la expresión de Fc γ RIIIA mediante análisis FACS usando experimentación rutinaria y se pueden usar expresores altos en los ensayos ADCC de la invención. En otros casos, se puede realizar el aislamiento de macrófagos peritoneales del bazo que expresan Fc γ R humano de ratones transgénicos con supresión genética tales como los descritos aquí.

Los linfocitos pueden recolectarse a partir de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población mononuclear aislada de células, la mayor parte de la actividad de ADCC ocurre a través de las células asesinas naturales (NK) que contienen Fc γ RIIIA pero no Fc γ RIIB en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en el desencadenamiento de ADCC de células NK y establecen los reactivos para ensayar con monocitos elutriados.

Las células diana utilizadas en los ensayos ADCC incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con el número de acceso ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp et al., 1976, *Cancer Res.* 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo células Raji con el número de acceso ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein et al., 1965, *J. Natl. Cancer Inst.* 34: 231-240) y células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein et al., 1968, *Cancer Res.* 28: 1300-10). Las células diana deben ser reconocidas por el sitio de unión al antígeno de la inmunoglobulina que se va a ensayar.

El ensayo ADCC se basa en la capacidad de las células NK para mediar la muerte celular a través de una vía apoptótica. Las células NK median la muerte celular en parte por el reconocimiento de Fc γ RIIIA de IgG unido a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos ADCC utilizados pueden ser ensayos basados en radioactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprende regiones Fc variantes comprende marcar células diana, por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, opsonizar células diana con un anticuerpo que reconoce una superficie celular receptor en la célula

diana a través de su sitio de unión al antígeno; combinar las células diana opsonizadas marcadas y las células efectoras en una proporción apropiada, que puede determinarse mediante experimentación rutinaria; recolección de las células; detectar la etiqueta en el sobrenadante de las células diana lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en la etiqueta utilizada. Las células diana se pueden marcar bien con un marcador radioactivo o bien con un marcador fluorescente, utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, [⁵¹Cr] Na₂CrO₄; y el éster acetoximetil del ligando potenciador de fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6'- dicarboxilato (TDA).

Se puede usar un ensayo fluorimétrico resuelto en el tiempo para medir la actividad de ADCC frente a células diana que han sido marcadas con el éster acetoximetil del ligando que mejora la fluorescencia 2,2':6',2"-terpiridina-6-6'- dicarboxilato (TDA). Tales ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase Blomberg et al., 1996, *Journal of Immunological Methods*, 193: 199-206.

En resumen, las células diana se marcan con el diéster de acetoximetilo permeable a la membrana de TDA (bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-6-6'-dicarboxilato, (BATDA), que difunde rápidamente a través de la membrana celular de las células viables. Las esterases intracelulares se separan de los grupos éster y la molécula TDA impermeable a la membrana regenerada queda atrapada dentro de la célula. Después de la incubación de las células efectoras y diana, por ejemplo durante al menos dos horas hasta 3.5 horas a 37°C, con menos de 5% de CO₂, la TDA liberada de las células diana lisadas está quelatada con Eu³⁺ y la fluorescencia de los quelatos de Europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro resuelto en el tiempo (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac).

El ensayo ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprende regiones Fc variantes puede comprender las siguientes etapas: Preferiblemente, se marcan 4-5x10⁶ células diana (por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, células Raji) bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-t-6"- dicarboxilato (Reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficacia de etiquetado óptima, el número de células diana usadas en el ensayo de ADCC preferiblemente no debe exceder de 5x10⁶. El reactivo BATDA se añade a las células y la mezcla se incuba a 37°C preferiblemente bajo CO₂ al 5% durante al menos 30 minutos. Las células se lavan a continuación con un regulador fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfipirazol 0.125 mM y medio que contiene 0.125 mM de sulfipirazol. Las células diana 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, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante utilizada en el ensayo de ADCC es específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno de cáncer. La inmunoglobulina en la que se introduce una variante de la región Fc de la invención puede unirse específicamente a cualquier cáncer o antígeno tumoral, tales como los enumerados en la sección 5.4. Además, la inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante de la invención puede ser cualquier anticuerpo terapéutico específico para un antígeno de cáncer, tal como los enumerados en la sección 5.4. En algunos casos, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante utilizada en el ensayo ADCC es un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 *J. Biol. Chem.* 257(12): 6987-6995) un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico ratón-humano 2H7 (Liu et al., 1987, *Journal of Immunology*, 139: 3521-6); o un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (p185 HER2) (Carter et al (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-9). Las células diana en el ensayo ADCC se eligen de acuerdo con la inmunoglobulina en la que se ha introducido una región Fc variante de la invención de manera que la inmunoglobulina se une específicamente a un receptor de superficie celular de la célula diana. Preferentemente, los ensayos ADCC de la invención se realizan usando más de un anticuerpo modificado, por ejemplo, anti-Her2/neu, 4-4-20, 2B6, Rituxan y 2H7, que albergan las variantes de Fc de la invención. En algunos casos, las variantes Fc de la invención se introducen en al menos 3 anticuerpos y se ensayan sus actividades ADCC. Aunque no se pretende limitarse a un mecanismo de acción particular, examinar al menos 3 anticuerpos en estos ensayos funcionales disminuirá la probabilidad de eliminar erróneamente una mutación Fc viable.

Las células diana opsonizadas se añaden a células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir relaciones efector: 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, el efector: objetivo es 75:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3.5 horas, a 37°C, bajo 5% de CO₂. Los sobrenadantes de células se recogen y se añaden a una solución ácida de europio (por ejemplo, Solución de Europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de Europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro resuelto en el tiempo (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan por incubación de células diana con 1% de TX-100 y solo medio respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide por incubación de células diana y efectoras en ausencia de anticuerpo. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como: Liberación experimental (ADCC)-AICC)/(MR-SR) x 100.

Las variantes Fc pueden caracterizarse tanto en los ensayos de ADCC dependientes de NK como dependientes de macrófagos. Las variantes de Fc de la invención tienen fenotipos alterados tales como una función efectora alterada como se ensaya en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos.

Los ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento pueden usarse para unir C1q y mediar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para determinar la unión C1q, se puede realizar un ELISA de unión a C1q. Un ensayo de ejemplo puede comprender lo siguiente: las placas de ensayo pueden recubrirse durante la noche a 4°C con una variante de polipéptido o polipéptido de partida (control) en regulador de recubrimiento. Las placas pueden entonces lavarse y bloquearse. Después del lavado, se puede añadir una alícuota de C1q humano a cada pozo y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se pueden añadir 100 µL de un anticuerpo conjugado con peroxidasa C1q anticomplemento de oveja a cada pozo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se puede lavar de nuevo con regulador de lavado y se pueden añadir 100 µl de regulador sustrato que contiene OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)) a cada pozo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, se puede dejar proceder durante 30 minutos y se detiene mediante la adición de 100 µl de NH₂SO₄ 4.5. La absorbancia puede entonces leerse a (492-405) nm.

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

Otra variante de ejemplo es aquella que tiene una mejor afinidad de unión para C1q humana que la molécula que comprende la región Fc de tipo salvaje. Dicha molécula puede presentar, por ejemplo, una mejora de aproximadamente dos veces o más, y de manera preferible aproximadamente cinco veces o más, en la unión de C1q humana en comparación con la molécula de origen que comprende la región Fc de tipo salvaje. Por ejemplo, la unión C1q humana puede ser de aproximadamente dos veces a aproximadamente 500 veces, y preferiblemente de aproximadamente dos veces o de aproximadamente cinco veces a aproximadamente 1000 veces mejorada en comparación con la molécula que comprende la región Fc de tipo salvaje.

Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Métodos 202:163 (1996). En resumen, diversas concentraciones de la molécula que comprende una región Fc variante y complemento humano se pueden diluir con regulador. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula que comprende una región Fc variante pueden diluirse a una densidad de aproximadamente 1x10⁶ células/ml. Pueden añadirse mezclas de la molécula que comprende una región Fc variante, un complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pozos de cultivo de tejidos de fondo plano y se deja incubar durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. A continuación se pueden añadir 50 µL de azul alamar (Accumed International) a cada pozo y se incuba durante la noche a 37°C. La absorbancia se mide usando un fluorómetro de 96 pozos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de la muestra se pueden calcular a partir de una curva estándar y el porcentaje de actividad en comparación con la molécula no variable, es decir, una molécula que comprende la región Fc de tipo salvaje para la variante de interés.

En algunas realizaciones, una variante de Fc de la invención no activa el complemento. Preferiblemente, la variante no parece tener ninguna actividad de CDC en el ensayo de CDC anterior. La invención también se refiere a una variante con CDC mejorado en comparación con una molécula parental (una molécula que comprende la región Fc de tipo salvaje), por ejemplo, mostrando una mejora de aproximadamente dos veces a aproximadamente 100 veces en la actividad de CDC *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, Los valores de IC₅₀ para cada molécula que se compara). Los ensayos de complemento se pueden realizar con suero de cobaya, conejo o humano. La lisis del complemento de las células diana puede detectarse controlando la liberación de enzimas intracelulares tales como la lactato deshidrogenasa (LDH), como se describe en Korzeniewski et al., 1983, Immunol. Methods 64 (3): 313-20; y Decker et al., 1988 J. Immunol Methods 115(1): 61-9; o la liberación de un marcador intracelular tal como europio, cromo 51 o indio 111 en el que las células diana se marcan como se describe en el presente documento.

5.2.8 Otros ensayos

Las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes también pueden ser ensayadas usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la unión de interacción Fc-FcγR. Cualquier instrumento SPR disponible comercialmente incluyendo, pero no limitado a, BIAcore Instruments, disponible de Biacore AB (Uppsala, Suecia); instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, RU), los sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón) y SPR Detector Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX) se pueden usar en la presente invención. Para una revisión de la tecnología basada en SPR, véase Mullet et al., 2000, Methods 22: 77-91; Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Además, cualquiera de los instrumentos SPR y los métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 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 la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y el control de su interacción con el otro miembro del par de unión en solución en tiempo real. SPR se basa en medir el cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que ocurre sobre la formación del complejo o la disociación. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que está en el corazón de la tecnología SPR; consiste en una superficie de vidrio revestida con una delgada capa de oro y constituye la base para una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Se dispone comercialmente de una variedad de chips sensores, especialmente de las empresas enumeradas anteriormente, todas las cuales pueden ser utilizadas en los métodos de la invención. Ejemplos de chips de sensor incluyen los disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Sensor Chip CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la invención puede inmovilizarse sobre la superficie de un chip de sensor utilizando cualquiera de los métodos de inmovilización y productos químicos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, el acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, el acoplamiento covalente mediante grupos sulfhidrilo, biotina a la superficie revestida con avidina, acoplamiento aldehído a grupos carbohidrato, y unión a través de la etiqueta de histidina con chips NTA.

En algunos casos, se pueden determinar los parámetros cinéticos de la unión de moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes, por ejemplo, inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante, a un Fc γ R utilizando un instrumento BIAcore (por ejemplo, el instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Cualquier Fc γ R puede usarse para evaluar la interacción con las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes. En una realización específica, el Fc γ R es Fc γ RIIIA, preferiblemente un Fc γ RIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en un caso, el Fc γ RIIIA monomérico soluble es la región extracelular de Fc γ RIIIA unida a la secuencia de enlazador-AVITAG (véase la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/439,498, presentada el 9 de Enero de 2003 (Expediente de Apoderado No 11183-004-888) y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/456,041 presentada el 19 de marzo de 2003).

En otro caso, el Fc γ R es Fc γ RIIB, preferiblemente un Fc γ RIIB dimérico soluble. Por ejemplo, en un caso, la proteína dimérica Fc γ RIIB soluble se prepara de acuerdo con la metodología descrita en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos. No. 60/439,709 presentada el 13 de enero de 2003.

Un ensayo de ejemplo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende una región Fc variante, en la que la molécula es el anticuerpo 4-4-20, a un Fc γ R utilizando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: BSA-FITC se inmoviliza en una de las cuatro celdas de flujo de una superficie de chip sensor, preferiblemente a través de la química de acoplamiento de amina, de tal manera que aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) de BSA-FITC se inmovilizan en la superficie. Una vez que se prepara una superficie adecuada, se pasan anticuerpos 4-4-20 que portan las mutaciones Fc sobre la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 μ g/mL a un caudal de 5 μ l/mL. El nivel de 4-4-20 anticuerpos unidos a la superficie oscila entre 400 y 700 RU. A continuación, se inyectan en la superficie a 100 μ l/min de anticuerpos la serie de dilución del receptor (Fc γ RIIA y proteína de fusión Fc γ RIIB-Fc) en regulador HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5) la regeneración entre diferentes diluciones de receptor se lleva a cabo preferiblemente mediante inyecciones de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM, pH 9.4; NaCl 3M. Cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica se contempla en el método.

Una vez que se recoge un conjunto de datos completo, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente utilizando algoritmos informáticos proporcionados por el fabricante de instrumentos SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto el K_{activo} como el K_{apagado}, a partir de los cuales se deduce la constante de unión al equilibrio aparente, K_d como la relación de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{apagado}/K_{activo}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados puede realizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados véase Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher et al., 1994, Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5: 65-71; Chaiken et al., 1992, Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton et al., 1995, Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83.

Los parámetros cinéticos determinados usando un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden usarse como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula de la invención en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método de ejemplo para predecir la eficacia de una molécula de la invención basada en parámetros cinéticos obtenidos a partir de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{apagado} para la unión de una molécula de la invención a Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB; trazado (1) K_{apagado} (wt)/K_{apagado} (mut) para Fc γ RIIIA; (2) K_{apagado} (mut)/K_{apagado} (wt) para Fc γ RIIB contra los datos del ADCC. Los números superiores a uno muestran una disminución de la tasa de disociación de Fc γ RIIIA y un aumento de la tasa de disociación de Fc γ RIIB en relación con el tipo salvaje; y posee y mejora la función ADCC.

5.3 Métodos para producir recombinantemente moléculas de la invención

5.3.1 Polinucleótidos que codifican moléculas de la invención

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican las moléculas, incluyendo los polipéptidos y anticuerpos, de la invención identificados mediante los métodos de la presente invención. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede ser determinada, por cualquier método conocido en la técnica.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos de las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que se identifican por los métodos de la presente invención, la secuencia de nucleótidos puede manipularse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a un sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, NY), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, generando sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

En un caso, cuando los ácidos nucleicos codifican anticuerpos, una o más de las CDR se insertan dentro de regiones estructurales usando técnicas rutinarias de ADN recombinante. Las regiones estructurales pueden ser regiones de estructura natural o de consenso, y preferiblemente regiones de estructura humana (véase, por ejemplo, Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 para una lista de regiones estructurales humanas).

En otro caso, las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica, se pueden cribar 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

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

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 huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato cálcico) y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir las moléculas de la invención. En casos específicos, la expresión de las moléculas de la invención está regulada por un promotor específico constitutivo, inducible o un tejido específico.

Las células huésped utilizadas para expresar las moléculas de la invención pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de inmunoglobulina entera recombinante. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking et al., 1998, *Gene* 45: 101, Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Se pueden utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de huésped para expresar las moléculas de la invención. Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de las moléculas de la invención pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden transformarse o transfectarse con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar las moléculas de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes para las moléculas de la invención; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican las moléculas de la invención; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican las moléculas de la invención; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican las moléculas de la invención o células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase US 5,807,715), células Per C.6 (células retinales humanas desarrolladas por Crucell) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero

(por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus, el promotor del virus de la vacuna de 7.5K).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado a la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no están limitados, al vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el marco con el *Lac Z* de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109, Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o factor Xa de modo que el producto de gen diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, se utiliza el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y se pone bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de 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 de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógena y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol., 153: 51-544).

Además, se puede escoger una cepa celular huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraducción de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamíferos incluyen, pero sin limitación, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de la invención. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño las células manipuladas se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan los anticuerpos de la invención. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con los anticuerpos de la invención.

Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo pero no limitándose a la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) se pueden emplear genes en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia a antimetabolitos puede utilizarse como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que

confiere resistencia al aminoglucósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y 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; Mayo de 1993, *TIB TECH* 11(5): 155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (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 et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & amp; Sons, NY; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1; e higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene* 30: 147).

Los niveles de expresión de un anticuerpo de la invención pueden aumentarse mediante amplificación vectorial (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *El uso de vectores basados en la amplificación génica para la expresión de genes clonados en células de mamífero en clonación de ADN*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Cuando un marcador en el sistema vectorial que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada es asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores idénticos seleccionables que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifique tanto polipéptidos de cadena pesada como de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxicos (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52, Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197). Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNco ADN genómico.

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

5.4 Métodos profiláticos y terapéuticos

La presente invención abarca la administración de una o más de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos) a un animal, preferiblemente a un mamífero, y lo más preferiblemente a un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en el que se desea una eficacia mejorada de la función de las células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por Fc γ R. Los métodos y composiciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedad neoplásica primaria o metastásica (es decir, cáncer) y enfermedades infecciosas. Las moléculas de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento. Como se detalla a continuación, las moléculas de la invención pueden usarse en métodos de tratamiento o prevención del cáncer (particularmente en inmunoterapia pasiva), enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas.

Las moléculas de la invención también se pueden utilizar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune de cáncer; trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con las moléculas y, aumentan la respuesta inmune. Las moléculas de la invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, por ejemplo, como se detalla en las Secciones 5.4.1.2 y 5.4.2.1 siguientes.

5.4.1 Cáncer

La invención abarca usos y composición para el tratamiento o prevención de cáncer o metástasis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden una región Fc variante.

Las moléculas de la invención (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden usarse para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o metástasis de células cancerosas. En una realización, la molécula de la invención comprende una variante Fc que se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis,

opsonización, etc. Tales moléculas pueden usarse solas para tratar o prevenir el cáncer. En otra realización, la molécula de la invención comprende una región Fc variante que se une a Fc γ R1A y/o Fc γ R1B con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ R1A y/o Fc γ R1B, y se une más a Fc γ R1B con una menor afinidad que a un polipéptido comparable que comprende una
 5 región Fc de tipo salvaje que se une a Fc γ R1B, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.. Tales moléculas también pueden usarse solas para tratar o prevenir el cáncer.

En algunas realizaciones, la invención abarca usos y composiciones para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto con polimorfismos de Fc γ R, tales como los homocigóticos para los alelos P γ R1A-158V o Fc γ R1A-158F.
 10 En algunas realizaciones, la invención abarca los anticuerpos terapéuticos de ingeniería, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores de acuerdo con la invención de tal manera que los anticuerpos manipulados tienen una eficacia mejorada en pacientes homocigóticos para el alelo de baja afinidad de Fc γ R1A (158F). En otras realizaciones, la invención abarca los anticuerpos terapéuticos de ingeniería, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores de acuerdo con la invención, de tal manera que los anticuerpos manipulados tienen una
 15 eficacia mejorada en pacientes homocigóticos para el alelo de alta afinidad de Fc γ R1A (158V).

En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la invención son particularmente eficaces en el tratamiento y/o la prevención del linfoma no Hodgkin (LNH). Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la invención son terapéuticamente más eficaces que los regímenes terapéuticos actuales para LNH, incluyendo pero no limitados a quimioterapia, e inmunoterapia usando mAb anti-CD20, Rituximab. Sin embargo, la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 depende del polimorfismo Fc γ R del sujeto (Carton et al., 2002, Blood, 99: 754-8, Weng et al., 2003, J Clin Oncol. 21(21): 3940-7).
 20

Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras y median ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores activadores de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras de mediar ADCC. Los métodos de la invención permiten la ingeniería de anticuerpos anti-CD20 que albergan mutaciones Fc para
 25 aumentar su afinidad a Fc γ R en células efectoras a través de sus dominios Fc alterados. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la invención proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para pacientes independientemente de su polimorfismo Fc γ R.

Un ejemplo de método para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-CD20 manipulados en un sujeto puede incluir lo siguiente: Los plásmidos que albergan genes de cadena pesada anti-HER2/neu quiméricos con mutaciones
 30 Fc que muestran un aumento sustancial de la muerte en ADCC pueden ser utilizados como columna vertebral para transferir en el dominio variable del gen de la cadena pesada de Rituximab. La región variable de la variante anti-HER2/neu Fc se sustituye por la variable región de Rituximab. Los plásmidos que contienen dominios Fc de tipo salvaje o una mutación D265A para anular la unión FcR, o las variantes anti-CD20 Fc se cotransfectan transitoriamente con el gen de la cadena ligera de Rituximab en células 293H, medios acondicionados y el
 35 anticuerpo se purifica sobre una columna de proteína G usando métodos rutinarios.

Los mAb anti-CD20 que albergan las variantes Fc se prueban mediante ADCC usando una línea de células B cultivadas para determinar la capacidad de las mutaciones Fc para mejorar ADCC. El ADCC estándar se lleva a cabo utilizando métodos descritos en el presente documento. Los linfocitos se recogen de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células Daudi objetivo, una línea de células B que expresan CD20, se cargan con Europio (Perkin Elmer) y se incuban con efectores durante 4 horas a 37°C. El Europio liberado se detecta mediante un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos ADCC resultantes indican la eficacia de las
 40 variantes Fc para activar la citotoxicidad mediada por células NK y establecer qué variantes anti-CD20 Fc pueden ensayarse tanto con muestras de pacientes como con monocitos elutriados. Las variantes Fc que muestran el mayor potencial para aumentar la eficacia del anticuerpo anti-CD20 se ensayan a continuación en un ensayo ADCC usando
 45 PBMCs de pacientes. PBMC de donantes sanos se utilizan como células efectoras. Los ensayos ADCC *in vitro* que usan variantes anti-CD20 y Rituximab se realizan en células de linfoma primario de pacientes con linfoma folicular. El polimorfismo específico de Fc γ R de los donantes se determina y cataloga usando métodos conocidos en la técnica. El ADCC ensayo se realiza por células efectoras de pacientes con diferentes genotipos Fc γ R1A y Fc γ R1B.

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 de cáncer aumentando la potencia de la
 50 función efectora del anticuerpo con relación a una molécula que contiene la región Fc de tipo salvaje, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. En una realización específica, la toxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o fagocitosis de células tumorales se mejora usando las moléculas de la invención con regiones Fc variantes. Las moléculas de la invención pueden aumentar la eficacia del tratamiento de cáncer de inmunoterapia al
 55 mejorar al menos una función efectora mediada por anticuerpos. En una realización particular, una molécula de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento de inmunoterapia mediante el aumento de la 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 inmunoterapéutico potenciando la fagocitosis y/o la opsonización de las células tumorales diana. En otra realización de la invención, la molécula de la
 60 invención que comprende una región Fc variante aumenta la eficacia del tratamiento mediante el aumento de la

citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (“ADCC”) en la destrucción de las células tumorales dirigidas.

- 5 La invención contempla además la ingeniería de anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) para aumentar la eficacia terapéutica del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, mejorando la función efectora del anticuerpo terapéutico (por ejemplo, ADCC). Preferiblemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo citotóxico y/o opsonizante. Un experto en la técnica apreciará que una vez que las moléculas de la invención con las propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácidos, cuya modificación que mejora la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc de tipo salvaje) han sido identificadas (véase la sección 5.2 y la Tabla 8) de acuerdo con los métodos de la invención, los anticuerpos terapéuticos pueden ser manipulados usando técnicas estándar ADN recombinante y cualquier técnica conocida de mutagénesis, como se describe en la Sección 5.2.2 para producir un tratamiento terapéutico modificado que lleva los sitios de mutación identificados con las propiedades de unión deseadas. Cualquiera de los anticuerpos terapéuticos enumerados en la Tabla 9 que han demostrado utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer, puede ser modificado de acuerdo con la invención, por ejemplo, modificando la región Fc para que tenga una afinidad mejorada para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA comparado con un anticuerpo terapéutico que tiene una región Fc de tipo salvaje, y se usa para el tratamiento y/o prevención de un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer. Otros anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos contra agentes patógenos tales como aquellos contra *Streptococcus pneumoniae*, Serotipo 6B, véase, por ejemplo, Sun et al., 1999, *Infection and Immunity*, 67(3): 1172-9.
- 20 Las variantes Fc de la invención pueden incorporarse en anticuerpos terapéuticos tales como los descritos en el presente documento o en otros candidatos clínicos de fusión Fc, es decir, una molécula que comprende regiones Fc que han sido aprobadas para nosotros en ensayos clínicos o cualquier otra molécula que pueda beneficiarse de las variantes de Fc de la presente invención, humanizadas, maduradas por afinidad, modificadas o manipuladas.
- 25 La invención también abarca la ingeniería de cualquier otro polipéptido que comprenda una región Fc que tenga utilidad terapéutica, incluyendo pero no limitado a ENBREL, de acuerdo con la invención, con el fin de aumentar 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 ser manipulados de acuerdo con el método de la invención

Compañía	Producto	Enfermedad	Meta
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor EGF
AltaRex	OvaRex ovarian	cáncer	antígeno tumor CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumor MUC1
Antisoma	Theragyn	cáncer de ovario	antígeno PEM
	(pemtumomabytrium-90) Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Bivatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Agudo MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Accidente cerebrovascular isquémico	gp IIIb/IIIa
	Bexocar	NHL	CD20
Corixa			
CRC Technology	MAB, idiotípico 105AD7	Vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72

ES 2 637 491 T3

Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	MAB, cáncer de pulmón	de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptin Herceptin Rituxan Rituxan MAB-VEGF MAB-VEGF	Cáncer de mama metastásico Cáncer de mama en etapa temprana Recidivante/refractario de bajo grado o folicular LNH Intermedio y de alto grado NHL NSCLC, metastásico cáncer colorectal, metastásico	HER-2 HER-2 CD20 CD20 VEGF VEGF
	AMD Fab E-26 (2ª gen. IgE)	la degeneración macular relacionada con la edad Asma alérgica y rinitis	CD18 IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + yttrium-90)	low grade of follicular, relapsed or refractory, CD20-positive, B-cell NHL and Rituximabrefractory NHL De bajo grado de LNH de células B folicular, recidivante o refractario, CD20 positivo y Rituximabrefractario LNH	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecan Cetuximab + cisplatin & radiation Cetuximab + gemcitabine Cetuximab + cisplatin + 5FU o Taxol EGF receptor Cetuximab + carboplatin + Paclitaxel Cetuximab + cisplatin	Carcinoma colorrectal refractario Cáncer de cabeza y cuello recientemente diagnosticados o recurrentes Carcinoma pancreático metastásico recién diagnosticado Cáncer de cabeza recurrente o metastásico Carcinoma de pulmón de células no pequeñas diagnosticado recientemente Cáncer de cabeza y cuello (extenso incurable Enfermedad local-regional y metástasis a distancia) Carcinoma de cabeza y	receptor EGF receptor EGF receptor EGF receptor EGF receptor EGF receptor EGF Imita el gangliósido GD3 Imita el gangliósido GD3 receptor VEGF

	IS-IL-2		
Millennium NeoRx	Campath (alemtuzumab) CD20-streptavidin (+ biotin-yttrium 90) Avidicin (albumin + NRLU13)	leucemia linfocítica crónica Cáncer metastásico	CD52 CD20 NA
Peregrine	Oncolym (+ iodine-131) Cotara (+ iodine-131)	Linfoma no Hodgkin Glioma maligno no resecable	HLA-DR 10 beta Proteínas asociadas al ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica) MAb, Cáncer de pulmón/riñón Nacolomab tafenatox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer de páncreas Cáncer de pulmón/riñón Colon y cáncer de páncreas	NA NA NA
Protein Design Labs	Nuvion SMART SMART	Neoplasias de células T M195 AML 1D10 NHL	CD3 CD33 Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac TriGem TriAb	Cáncer colorrectal, avanzado Melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas Cáncer de mama metastásico	CEA GD2-gangliósido MUC-1
Trilex	CEAVac TriGem TriAb	Cáncer colorrectal, avanzado Melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas Cáncer de mama metastásico	CEA GD2-gangliósido MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado Monopharm C GlioMAb - H (+ toxina de gelonina)	Linfoma no Hodgkin Carcinoma colorrectal y pancreático Glioma, melanoma y neuroblastoma	NA antígeno SK-1 NA
Xoma	Rituxan Rituxan ING-1	LNH recidivado/refractario de bajo grado o folicular Intermedio y de alto grado NHL	CD20 CD20 Ep-CAM

		adenomcarcinoma	
--	--	-----------------	--

5 Por consiguiente, la invención proporciona usos para prevenir o tratar cáncer caracterizados por un antígeno de cáncer, usando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico y ha sido modificado en uno o más sitios en la región Fc, de acuerdo con la invención, para unirse Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad que el anticuerpo terapéutico padre, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) de manera más eficaz. En otra realización, la invención proporciona métodos para prevenir o tratar el cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, utilizando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico, y ha sido diseñado de acuerdo con la invención para unirse a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una mayor afinidad y unirse a Fc γ RIIB con una afinidad más baja que el anticuerpo terapéutico padre, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) de manera más eficaz. Los anticuerpos terapéuticos que han sido diseñados de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, ya que tienen una actividad citotóxica mejorada (por ejemplo, eliminación de células tumorales mejorada y/o mejorada por ejemplo 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 a un antígeno de cáncer y es citotóxico, y ha sido diseñado de acuerdo con la invención para tener, por ejemplo, una función efectora mejorada. En una realización particular, los anticuerpos terapéuticos diseñados de acuerdo con la invención aumentan el efecto citotóxico mediado por anticuerpo del anticuerpo dirigido al antígeno de cáncer particular. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los siguientes antígenos de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y composiciones de la invención: antígeno de carcinoma de KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 32-37, Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2): 48-475), fosfato de ácido prostático (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1): 4928), antígeno específico de la próstata (Henittu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys Res. Comm. 10(2): 903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53: 227-230), antígeno asociado al melanoma p97 (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-44), antígeno de melanoma gp75 Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55-3; Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144)), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), antígeno polimórfico de mucina epitelial, antígeno de glóbulos grasos de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol., 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff et al., 1994, Blood 83: 435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36: 373-380), gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250), tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus que incluyen virus tumorales de ADN de antígeno T y antígenos de envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom et al., 1985, Cancer Res. 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immunol. 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359), antígeno de linfocito humano maligno-APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57), tal como el antígeno I encontrado en los eritrocitos fetales y el endodermo primario, I(Ma) en los adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 se encuentran en el epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIMD5 y D₁56-22 se encuentran en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en el adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en el cáncer gástrico. El hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor EGF (grupo sanguíneo ALe^p/Le^y) encontrado en el adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en las células mieloides, R₂₄ se encuentra en el melanoma. 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones de 4 a 8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado de un receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

60 Los cánceres y trastornos relacionados que pueden ser tratados o prevenidos por los usos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Las leucemias incluyen, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblástica, promielocítica,

mielomonocítica, monocítica, leucemias de eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero no limitado a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células vellosas; policitemia vera; linfomas tales como pero no limitados a la enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple sin ardor, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas óseos y del tejido conjuntivo tales como, pero no limitado a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo pero no limitado a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor nonglial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), 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 adrenal, incluyendo pero no limitado a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no limitado a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, incluyendo, pero sin limitarse a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor de secreción de somatostatina y tumor de células carcinoides o de islotes; cánceres de la pituitaria incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, tumor secretador de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cáncer de ojo incluyendo, pero no limitado a, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma corioideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva, incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres ováricos que incluyen pero no se limitan a, carcinoma epitelial ovárico, tumor limfítico, tumor de células germinales y tumor estromal; cáncer de esófago incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenocítico cístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoscamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cáncer de estómago incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma, hongo (polipoide), ulceración, extensión superficial, difusión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cáncer de colon; cáncer rectal; cánceres de hígado incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo, pero sin limitarse a, papilar, nodular y difuso; cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares incluyendo, pero sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cáncer de próstata incluyendo pero no limitado a adenocarcinoma, leiomiomas y rhabdomyosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales que incluyen pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; los cánceres de las glándulas salivales que incluyen pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe incluyendo pero no limitado a, cáncer de células escamosas y verrugoso; cáncer de piel incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso; cáncer de riñón incluyendo, pero no limitado a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o ureter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen miosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos ver Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, los usos y composiciones de la invención son también útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, incluyendo (pero no limitándose a) lo siguiente: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cérvix, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetraocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular de la tiroides y

teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis también se tratarán mediante los métodos y composiciones de la invención. Tales cánceres pueden incluir, pero no limitarse a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores hormonales dependientes de la mama, próstata y ovario y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En formas de realización específicas, se tratan o previenen cambios malignos o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos mediante los métodos y composiciones de la invención en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, la piel, el páncreas o el útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, melanoma o leucemia se trata o se previene mediante los usos y 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 diseñado de acuerdo con los métodos de la invención) inhibe o reduce el crecimiento de tumor primario o metástasis de células cancerosas en al menos el 99%, por lo menos el 95%, por lo menos el 90%, por lo menos el 85%, por lo menos el 80%, por lo menos el 75%, por lo menos el 70%, por lo menos el 60%, por lo menos el 50%, por lo menos el 45%, por lo menos el 40%, al menos un 45%, al menos un 35%, al menos un 30%, al menos un 25%, al menos un 20% o al menos un 10% con respecto al crecimiento de tumor primario o metástasis en ausencia de dicha molécula de la invención.

5.4.1.1 Terapia de combinación

La invención comprende además la administración de las moléculas de la invención en combinación con otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o la prevención del cáncer, incluyendo pero sin limitarse a quimioterapias convencionales y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapia o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes anticancerígenos, anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos enumerados en la Tabla 9) u otros agentes conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención del cáncer (véase la sección 5.4.1.2).

En ciertas realizaciones, una o más moléculas de la invención se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, al mismo tiempo que uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que significa 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 de manera que la molécula de la invención pueda actuar conjuntamente con otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier ruta adecuada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de separación, con una separación de aproximadamente 1 hora, aproximadamente de 1 hora a aproximadamente 2 horas de separación, aproximadamente entre 2 horas y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas de separación, entre unas 4 horas y unas 5 horas, entre unas 5 horas y unas 6 horas, entre unas 6 horas y unas 7 horas, entre unas 7 horas y unas 8 horas, entre unas 8 horas y unas 9 de separación, entre unas 9 horas y unas 10 horas, entre unas 10 horas y unas 11 horas, entre unas 11 horas y unas 12 horas entre sí, no más de 24 horas de separación o no más de 48 horas de separación. En realizaciones preferidas, dos o más componentes se administran dentro de la misma visita del paciente.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con un intervalo de aproximadamente 2 a 4 días, con un intervalo de aproximadamente 4 a 6 días, aproximadamente 1 semana, con una separación de aproximadamente 1 a 2 semanas o más de 2 semanas de separación. En realizaciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un marco de tiempo en el que ambos agentes están todavía activos. Un experto en la técnica podría determinar dicho período de tiempo determinando la vida media de los agentes administrados.

En ciertas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un período de tiempo y la repetición de 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 mejora la eficacia del tratamiento.

En ciertas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos 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.

En aún otras realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea mediante infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso extendidos. Dicha administración metronómica puede implicar dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Típicamente, los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se utilizan en dosis más bajas. Tales regímenes de dosificación abarcan la administración crónica diaria de dosis relativamente bajas durante largos períodos de tiempo. En realizaciones preferidas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los períodos de descanso. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran mediante infusión crónica de dosis baja o continua que varía 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 meses, hasta aproximadamente 3 meses, hasta aproximadamente 4 meses, hasta aproximadamente 5 meses, hasta aproximadamente 6 meses. La programación de tales regímenes de dosis puede ser optimizada por el oncólogo experto.

En otras realizaciones, los cursos de tratamiento se administran simultáneamente a un mamífero, es decir, las dosis individuales de los agentes terapéuticos se administran por separado, sin embargo, dentro de un intervalo de tiempo tal que las moléculas de la invención pueden trabajar conjuntamente con el o los otros agentes. Por ejemplo, se puede administrar un componente una vez por semana en combinación con los otros componentes que se pueden administrar una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación para la terapéutica se llevan a cabo simultáneamente incluso si los agentes terapéuticos no se administran simultáneamente o en la misma visita del paciente.

Cuando se usan 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, más preferiblemente, sinérgicamente. En una realización, una molécula de la invención se administra concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. En otra realización, una molécula de la invención se administra simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas separadas. En aún otra realización, se administra una molécula de la invención antes o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. La invención contempla la administración de una molécula de la invención en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos por la misma o diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. En ciertas realizaciones, cuando una molécula de la invención se administra simultáneamente con otro agente profiláctico o terapéutico que potencialmente produce efectos secundarios adversos incluyendo, pero no limitado a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que cae por debajo del umbral en el que el efecto secundario adverso es provocado.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en la presente invención están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaces y profilácticamente eficaces. La dosis y la frecuencia también variarán típicamente de acuerdo con factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia clínica pasada del paciente. Los regímenes adecuados pueden ser seleccionados por un experto en la técnica considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones indicadas en la bibliografía y recomendadas en Physician's Desk Reference (56ª edición, 2002).

5.4.1.2 Otros agentes terapéuticos/profilácticos

En una realización específica, los usos de la invención abarcan la administración de una o más moléculas de la invención con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento y/o la prevención del cáncer. En una realización, los inhibidores de la angiogénesis se pueden administrar en combinación con las moléculas de la invención. Los inhibidores de la angiogénesis que pueden usarse en los usos y composiciones de la invención incluyen pero no se limitan a: Angiostatina (fragmento de plasminógeno): antitrombina III antiangiogénica; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado del cartílago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de 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 (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa placentaria; inhibidor activador del plasminógeno; factor plaquetario-4 (PF4); Prinomastat; prolactina 16kD fragmento; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; solimastat; Esqualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahydrocortisol-S; Tetratiomolibdato; talidomida; trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; Factor de crecimiento transformante beta (TGF-b); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerosos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesilucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramcina; asparagina; asperlin;

azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucil; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorrubicina; estramustina; estramustina fosfato sódico; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiourea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleuquina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-lb; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozole; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maytansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcin; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargase; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsonina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza uracil; uredepa; vaporeotide; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vencilcinato; sulfato de vinelurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubina. Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética antidorsalizante-1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrogénico; antineoplaston; 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; azatrosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilastausporina; derivados de beta lactama; betaaetina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilaspermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflate; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofostina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; cloro; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cisporfirina; cladribina; análogos del clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacin A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemlcin; octoesfato de citarabina; factor citofílico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshiodridemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; 9-dihidrotaxol; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristeride; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexameten bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones: interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamellarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentina; leptolstatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozole; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico: compuestos lipófilos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxorribina; lurtotecan; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de matriz de metaloproteinasas; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostima; ARN de doble cadena no coincidente; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factores de crecimiento de fibroblastos de mitoxina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor de múltiples genes de resistencia a genes; terapia con un supresor

de tumores múltiple 1; agente contra el cáncer de mostaza; micaperoxida B; extracto micobacteriano de la pared celular; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; napterpin; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitroxido antioxidante; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citoquinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrhizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelliptina; pegaspargasa; pelesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina j2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de farnesil proteína transferasa ras; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; retelliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohituquina; romurtida roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; sarCNU; sarcófito A; sargramostim; Sdi 1 miméticos; semustina; inhibidor derivado de la senescencia 1; oligonucleótidos de sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermin; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estiramida; inhibidores de la tirosina quinasa; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; tallimustina; metyoduro de tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; talibastina; tiocoralina; trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor totipotente de las células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; tricitribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterido; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor uroquinasa; vapreotide; variolin B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimulador de zinostatina. Los fármacos anticancerígenos adicionales preferidos son el 5-fluorouracilo y la leucovorina.

Ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los usos de la invención incluyen, pero no se limitan a, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención del rechazo agudo de aloinjerto renal; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-1A de IgG2a (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG anti-idiotipo murino (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado antiintegrador de la integrina α V3 (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 IgG (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo humanizado anti-CD22 IgG (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); 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 humanizado IgG (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor de complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF- α humano humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento anti-TNF- α Fab humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 IgG1 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo anti-TNF- α IgG4 humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo humanizado anti-CD40L IgG (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β 2 humano (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 9.

5.4.2 Enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias

Aunque no forma parte de la invención, la descripción también proporciona moléculas que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc variante para Fc γ RIIB pero hace disminuir la afinidad de la región Fc de la variante para Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA. Las moléculas con tales características de unión son útiles en la regulación de la respuesta inmune, por ejemplo, en la inhibición de la respuesta inmune en relación con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende estar limitado por ningún mecanismo de acción, las moléculas con una mayor afinidad por Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA pueden conducir a amortiguar la respuesta de activación a Fc γ R y la inhibición de la capacidad de respuesta celular.

- En algunos casos, una molécula que comprende una región Fc variante no es una inmunoglobulina, y comprende al menos una modificación de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB con respecto a una molécula que comprende una proteína de tipo salvaje Fc. En otros casos, dicha molécula comprende además una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que disminuyen la afinidad de la molécula por un Fc γ R de activación. En algunos casos, la molécula es una región Fc soluble (es decir, no unida a la membrana). Otras modificaciones de aminoácidos dentro de la región Fc soluble pueden modular su afinidad por diversos receptores Fc, incluyendo aquellos conocidos por un experto en la técnica como se describe en el presente documento. En otros casos, la molécula (por ejemplo, la región Fc que comprende al menos una o más modificaciones de aminoácidos) se modifica usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica y como se describe en el presente documento para aumentar la vida media *in vivo* de la región Fc. Dichas moléculas tienen utilidad terapéutica en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno autoinmune. Aunque no pretenden estar limitadas por ningún mecanismo de acción, tales moléculas con mayor afinidad para Fc γ R1IB conducirán a un amortiguamiento de los receptores activadores y, por tanto, a un amortiguamiento de la respuesta inmune y tienen una eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune.
- En ciertos casos, una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA 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 un caso, una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA comprenden una sustitución en la posición 247 con leucina. En otro caso, la modificación de uno o más aminoácidos, que aumenta la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB, pero disminuye la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA, comprende una sustitución en la posición 372 con tirosina. En otro caso, la modificación de uno o más aminoácidos que aumenta la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA comprende una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico. En un caso, la modificación de uno o más aminoácidos, que aumenta la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante para Fc γ R1IIIA comprenden una sustitución en la posición 224 con leucina.
- Las regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada para Fc γ R1IB y una afinidad disminuida para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje, pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. La presente descripción proporciona métodos para prevenir, tratar o administrar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmune o inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada para Fc γ R1IB y una afinidad disminuida para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje.
- La divulgación también proporciona métodos para prevenir, tratar o administrar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende además administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. La descripción también proporciona métodos para prevenir, tratar o administrar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune que comprende además administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La Sección 5.4.2.1 proporciona ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.
- Ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden tratarse administrando las moléculas incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampuloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioglobulinas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, la tiroiditis de Hashimoto, pulmonar idiopática fibrosis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), IgA neuropatía, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes inmune mediada de tipo 1 o mellitus, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliartritis 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 del hombre rígido, lupus sistémico eritematoso, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar,

espondiloartropatía indiferenciado, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, y la inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe aquí en la sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunes están asociados con una afección inflamatoria. Por lo tanto, hay superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Ejemplos de trastornos inflamatorios que se pueden prevenir, tratar o administrar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Las moléculas de la invención con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada para Fc γ RIIB y una afinidad disminuida para Fc γ RIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje también se pueden usar para reducir la inflamación experimentada por los animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la invención reduce la inflamación en un animal en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20% o al menos el 10% con respecto a la inflamación en un animal, que no se administra a dicha molécula.

Las moléculas de la invención con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada para Fc γ RIIB y una afinidad disminuida para Fc γ RIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje también se pueden usar para evitar el rechazo de trasplantes.

La invención contempla además la ingeniería de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria, de modo que los anticuerpos comprendan una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos que han sido identificados por los métodos de la invención que tienen una afinidad mejorada para Fc γ RIIB y una afinidad disminuida para Fc γ RIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que pueden ser manipulados de acuerdo con la invención se presenta en la Tabla 10A y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunes se presenta en la Tabla 10B.

Tabla 10A: Anticuerpos para enfermedades inflamatorias y enfermedades auto-inmunes que se pueden ingenierar de acuerdo con la invención.

Nombre del anticuerpo	Antígeno objetivo	Producto Tipo	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Inc Pharm	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Inc Pharm	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Inc Pharm	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Inc Pharm	Bypass cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Inc Pharm	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Inc Pharm	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo del aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple

ES 2 637 491 T3

Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo del aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo del aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn's
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectin	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Factor 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	Carrera
IC14	CD14	Primatised		ICOS Pharm Inc	Shock tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatised		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatised	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatised		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.)	Carrera
LDP-01	beta2-	Humanizado	IgG	Millennium Inc	Rechazo del aloinjerto

ES 2 637 491 T3

	integrina			(LeukoSite Inc.)	
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado	Milenium	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerativa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Shock tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Cent eon	Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai / Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvDH
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo del aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
Orthoclone/ anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo del aloinjerto
RepPro/ Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de la angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/No vartis/Tanox Biosystems	Asma/Alergia
Sub-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SB-240683	IL4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Sche ring	Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo del aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo del aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo del aloinjerto

Tabla 10B: Anticuerpos para trastornos autoinmunes que pueden ser manipulados

Anticuerpos	Indicaciones	Antígeno objetivo
ABX-RB2		Anticuerpo contra el antígeno CBL en células T, células B y células NK, anticuerpos completamente humanos procedentes del Xenomouse
5c8 (anticuerpo de ligando anti CD-40)	Los ensayos de Fase II se detuvieron en octubre de 99 para examinar "eventos adversos"	CD40
IDEC 131	Lupus eritematoso sistémico (LES)	Anti CD40 humanizado
IDEC 151	Artritis reumatoide	Primatizado; Anti-CD4
IDEC 152	Asma	Primatizado; Anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	Primatizado; Anti-CD80
MEDI-507	Artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn, psoriasis	Anti-CD2
LDP-02 (anti-b7 mAb)	Enfermedad inflamatoria intestinal enfermedad de Crohn colitis ulcerosa	Receptor de integrina a4b7 sobre los glóbulos blancos (leucocitos)
SMART Anti-Gamma Interferón anticuerpos	Enfermedades autoinmunes	Interferón anti-gamma
Verteportin	Artritis reumatoide	
MDX-33	Trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunes Idiopática Trombocitopenia Purpura (ITP) anemia hemolítica autoinmune	Anticuerpo monoclonal contra los receptores FcRI
MDX-CD4	Tratar la artritis reumatoide y otra autoinmunidad	Anticuerpo monoclonal contra la molécula del receptor CD4
VX-497	Trastornos autoinmunes esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria intestinal lupus psoriasis	Inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para fabricar nuevos ARN y ADN utilizados en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	Artritis reumatoide	Inhibidor de ICE
		Interleucina-1 beta (la enzima de conversión controla las vías conducentes a una respuesta inmune agresiva)
VX-745	Específicos de la inflamación que intervienen en la señalización química de la respuesta de la respuesta inmune y la progresión de la inflamación	Inhibidor de la proteína quinasa activada con mitógeno P38MAP quinasa
Enbrel (etanercept)		Se dirige al TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		

<p>Apogen MP4</p>		<p>El antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas a la enfermedad induce la apoptosis Las células T eliminadas por la muerte celular programada ya no atacan las células propias del cuerpo apogenes específicos las células T específicas del objetivo</p>
--------------------------	--	---

5.4.2.1 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

5 Se describen métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada para Fc γ R1IB y una afinidad disminuida para Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA junto con otros agentes de tratamiento. Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetil, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de los receptores de células T y moduladores del receptor de citoquinas.

10 Los agentes antiinflamatorios han mostrado éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes y son ahora un tratamiento común y estándar para tales trastornos. Cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por los expertos en la técnica puede usarse en los métodos de la invención. Ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metil xantinas. Ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentin (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

5.4.3 Enfermedad infecciosa

25 La divulgación también proporciona 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 ser tratadas o evitadas por las moléculas de la invención son causadas por agentes infecciosos que incluyen pero no se limitan a virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

30 Las enfermedades víricas que pueden ser tratadas o evitadas usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las 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, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincicial, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, virus Coxsackie, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la poliomielitis, viruela, virus de Epstein-Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades virales tales como la mineritis viral, la encefalitis, el dengue o la viruela.

35 Las enfermedades bacterianas que pueden ser tratadas o prevenidas usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención, que son causadas por bacterias incluyen, pero no se limitan a, micobacterias rickettsia, micoplasma, neisseria, S. pneumonia, Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), Bacillus antracis (ántrax), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, pertissus, cólera, peste, difteria, clamidia, S. aureus y legionella.

40 Las enfermedades protozoarias que pueden ser tratadas o evitadas usando las moléculas de la invención junto con los métodos de la presente invención, que son causadas por protozoos, incluyen, pero no se limitan a, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

45 Las enfermedades parasitarias que pueden ser tratadas o prevenidas usando las moléculas de la invención, que son causadas por parásitos incluyen, pero no se limitan a, clamidia y rickettsia.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes tienen una función efectora de anticuerpos mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, con relación a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. Ejemplos de

agentes infecciosos incluyen, pero sin limitación a bacterias (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), *Bordetella pertussis*; virus de la enfermedad de Borna (BDV); coronavirus bovino; virus de la coriomeningitis; virus del dengue, virus E. coli, Ebola, Echovirus 1, Echovirus 11 (EV), endotoxina (LPS), bacterias entéricas, virus entérico huérfano; enterovirus; virus de leucemia felina; virus de la fiebre aftosa, virus de la leucemia de los simios de Gibbon (GALV), bacterias gramnegativas, *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis B (VHB), virus del herpes simple, VIH-1, citomegalovirus humano, coronavirus humano, Influenza A, B y C, Legionella, Leishmania mexicana, Listeria monocytogenes, virus del sarampión, Meningococo, Morbillivirus, Virus de la hepatitis del ratón Virus de la leucemia murina Virus del herpes gamma murino, retrovirus murino, Virus de hepatitis de ratón de coronavirus murino: Mycobacterium avium-M; Neisseria gonorrhoeae; Virus de la enfermedad de Newcastle; Parvovirus B19: Plasmodium falciparum; Virus Pox; Pseudomonas; Rotavirus; Samonella typhiurium: Shigella; Estreptococos; Virus linfotrópico de células T 1; virus Vaccinia).

En una realización específica, las moléculas de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa aumentando la fagocitosis y/o la 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 aumentando el ADCC de las células infectadas que causan la enfermedad infecciosa.

En algunos casos, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Las moléculas de la invención pueden usarse en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima Cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxil (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 aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomicina), antibióticos anfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tiamfenicol) (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefemas (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxil, cefamandole, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo cefbuperazona, cefmetazole y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefemas (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina de sodio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamccillina, hidrato de penetamicina, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilina y fencihicilina potasio), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, endureacidina, enviomicina, tetraciclinas (p.ej. apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolona y sus análogos (por ejemplo, cinoxacina, clinafloxacina, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilosulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona de sodio y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

En ciertos casos, las moléculas de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Los agentes antifúngicos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, anfotericina B, itraconazol, quetoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofuldina.

En algunos casos, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales útiles que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a inhibidores de proteasa, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa y análogos de nucleósidos. Ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero sin limitación, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los alfa-interferones; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.5 Terapia con vacuna

También se divulga el uso de una composición de la invención para inducir una respuesta inmune contra un agente antigénico o inmunogénico, incluyendo pero sin limitarse a antígenos de cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas (ejemplos de los cuales se describen a continuación). Las composiciones de vacuna de la invención comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos hacia los que se desea una respuesta inmune, en la que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos se recubren con un anticuerpo variante de la invención que

5 tiene una afinidad mejorada con Fc γ R11A. Aunque no se pretende limitarse a un mecanismo de acción particular, el recubrimiento de un agente antigénico o inmunogénico con un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad mejorada con Fc γ R11A, aumenta la respuesta inmune al agente antigénico o inmunogénico deseado induciendo respuestas humorales y mediadas por células. Las composiciones de vacuna de la invención son particularmente eficaces para provocar una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

10 En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna de la invención comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmune. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos, y son preferiblemente atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede llevarse a cabo usando métodos estándar conocidos por un experto en la técnica. La invención abarca una vacuna viral recombinante viva o una vacuna vírica recombinante inactivada para formularse de acuerdo con la invención. Se puede preferir una vacuna viva porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar al que ocurre en las infecciones naturales y, por lo tanto, confiere inmunidad sustancial y duradera. La producción de tales formulaciones de vacunas de virus recombinantes vivos se puede llevar a cabo usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en el alantoide del embrión de pollo seguido de purificación.

15 En una realización específica, el virus recombinante es no patógeno para el sujeto al que se administra. A este respecto, el uso de virus modificados genéticamente para fines de vacunas puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, eliminaciones) en las plantillas usadas para transfección puede proporcionar los nuevos virus con características de atenuación. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones de eliminación específicas que están asociadas con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío en mutaciones de eliminación. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con los mutantes fríos o sensibles a la temperatura y las frecuencias de reversión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para la ingeniería de virus recombinantes se conocen en la técnica y se incluyen en la invención. Por ejemplo, las técnicas para modificar virus de ARN de cadena negativa son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,166,057.

20 Alternativamente, pueden construirse virus quiméricos con características de "suicidio" para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmica de la invención. Dichos virus pasan por solo una o pocas rondas de replicación dentro del anfitrión. Cuando se utiliza como vacuna, el virus recombinante atraviesa ciclos de replicación limitados e induce un nivel suficiente de respuesta inmune, pero no iría más lejos en el huésped humano y causaría enfermedad. Alternativamente, el virus inactivado (muerto) puede formularse de acuerdo con la invención. Las formulaciones de vacuna inactivadas pueden prepararse usando técnicas convencionales para "matar" los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están "muertas" en el sentido de que su infectividad ha sido destruida. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede crecer en cultivo celular o en el alantoide de embrión de pollo, purificado por ultracentrifugación zonal, inactivado por formaldehído o β -propiolactona y mezclado.

30 En ciertas realizaciones, los epítomos completamente extraños, incluyendo antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales, pueden ser manipulados en el virus para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmica de la invención. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados tales como antígenos de parásitos de VIH (gp160, gp120, gp41) (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos de tumores pueden ser manipulados en la cepa atenuada.

35 Prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga puede construirse en los virus quiméricos de la invención para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítomos que inducen una respuesta inmune protectora a cualquiera de una variedad de patógenos o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes pueden expresarse por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en los virus quiméricos incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina neuraminidasa de influenza y parainfluenza y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F de PIV3 humano. En otra realización más, las secuencias génicas heterólogas que pueden ser modificadas genéticamente en los virus quiméricos incluyen las que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimuladores de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12 y antagonistas de estos agentes.

40 En aún otras realizaciones, la invención abarca células patógenas o virus, preferiblemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo variante en su superficie.

45 En realizaciones alternativas, las composiciones de vacuna de la invención comprenden un polipéptido de fusión en el que un agente antigénico o inmunogénico está unido operativamente a un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad mejorada para Fc γ R11A. Los polipéptidos de fusión de ingeniería para uso en las composiciones de vacuna de la invención se llevan a cabo utilizando procedimientos de tecnología de ADN recombinante de rutina y están dentro del nivel de habilidad ordinaria.

También se proporcionan métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición de la invención. Preferiblemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto, comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante de la invención, en el que el anticuerpo variante tiene una mayor afinidad con Fc γ RIIB. Aunque no se pretende que estén unidas por un mecanismo de acción particular, tales composiciones son eficaces para inducir tolerancia mediante la activación de la vía inhibidora mediada de Fc γ RIIB.

5.6 Composiciones y métodos de administración

La invención proporciona usos 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 mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de 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. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada, se purifica sustancialmente (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, preferiblemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono como un mono cynomolgous y un humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En aún otra realización preferida, el anticuerpo de la invención es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar 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 (ver, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Métodos de administración de una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, rutas intranasales y orales). En una realización específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos 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. Además, la administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La invención también proporciona que las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden regiones Fc variantes, se envasen en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado en seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y se pueden reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de la invención se suministran en forma de polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente 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 almacenarse entre 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas preferiblemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, en 3 horas o dentro de 1 hora después de ser reconstituidas. En una realización alternativa, las moléculas de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado indicando la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas de la invención se suministra en un recipiente herméticamente cerrado al menos 1 mg/ml, más preferiblemente 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/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección y deberá decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales.

Para anticuerpos abarcados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente está comprendida 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, 0.001 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 vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos foráneos. Por lo tanto, a menudo son posibles dosis menores de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención o fragmentos de la misma puede reducirse aumentando la captación y la penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

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 usa como terapia de agente 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 menor que cuando dichas moléculas se usan como terapia de un solo agente.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente a la zona que necesita tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas elásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la invención, se debe tener cuidado de usar materiales a los que la molécula no se absorba.

En otra realización, las composiciones se pueden administrar en un vesículo, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990), Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989), Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327, véase generalmente *ibid.*).

En aun otra realización, las composiciones se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más moléculas de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39: 179-189, Song et al., 1995, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *PDA Journal of Pharmaceutical Sciences & Technology* 50: 372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Anticorps for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760.

En una realización, se puede usar una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, *supra*, Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed Eng.* 14:20 Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88: 507 y Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984), Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, véase también Levy et al., 1985, *Science* 228: 190, During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351, Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.*, 7, 1:105); Patente de los Estados Unidos No. 5,679,377; Patente de los Estados Unidos No. 5,916,597; Patente de los Estados Unidos No. 5,912,015; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,463; Patente de Estados Unidos No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno coacetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, Vol. 2, páginas 115-138 (1984)). En otra realización, se utilizan composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada de acuerdo con Dunn et al. (Véase US 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación puede ocurrir generalmente en cualquier parte dentro del cuerpo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. En otra realización, se utiliza un sistema de suministro sostenido no polimérico, por lo que se utiliza un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como un sistema de suministro de fármacos. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición en el fluido del tejido circundante y el material no polimérico coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz sólida y microporosa (véase el documento US 5,888,533).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,526,938; Publicaciones Internacionales Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39: 179-189; Song et al., 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372-397; Cleek et al., 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854; y Lam et al., 1997, *Proc. Int'l.*

Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760.

En una realización específica en la que 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 apropiado y administrarlo de manera que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente US No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes, Biolistic, Dupont) o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en enlace con un péptido tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación homóloga.

Para los anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es típicamente de 0.1 mg/kg a 200 mg/kg del peso corporal del sujeto. Preferiblemente, la dosis administrada a un sujeto está entre 0.1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto y más preferiblemente la dosificación administrada a un sujeto está entre 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosificación y la frecuencia de administración de anticuerpos de la invención pueden reducirse también aumentando la captación y la penetración en el tejido (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipídación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la invención puede incluir un solo tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con moléculas de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0.1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 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 al año. También se apreciará que la dosificación eficaz de las moléculas utilizadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el curso de un tratamiento particular.

5.6.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención incluyen composiciones farmacéuticas a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no esterilizadas) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para administración a un sujeto o paciente) que pueden ser utilizadas en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en el presente documento o una combinación de dichos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprende una región Fc variante, donde dicha región Fc variante se une a Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIIA y/o Fc γ R1IIA 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 de tipo salvaje y una región farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprende una región Fc variante, donde dicha región Fc variante se une a Fc γ R1IIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIIA y dicha región Fc variante se une a Fc γ R1IIB con una afinidad más baja que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje se une a Fc γ R1IIB, 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 de tipo salvaje, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además uno o más agentes anticancerígenos.

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

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador del gobierno Federal o de un estado o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. 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. Los vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad del agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la invención se pueden formular como formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, aquellas formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5.6.2 Terapia génica

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican moléculas de la invención pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, mediante terapia génica. La 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 codificado o proteína de fusión que media un efecto terapéutico o profiláctico.

Se pueden usar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. A continuación se describen métodos de ejemplo .

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-96; Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; Mayo de 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

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. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica del anticuerpo que codifica los ácidos nucleicos (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935, y Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438).

En otro aspecto preferido, una composición de la invención comprende 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. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos operativamente a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y opcionalmente, específico de tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada está flanqueada 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 administración de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto está directamente expuesto a los vectores portadores de ácidos nucleicos o de ácidos nucleicos, o indirectos, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, luego se trasplantan al sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En un caso específico, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresa para

producir el producto codificado. Esto puede conseguirse mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de manera que se vuelvan intracelulares, por ejemplo, mediante infección utilizando vectores virales retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante 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 transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas en unión a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo en unión a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432) (que puede utilizarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otro caso, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido fusogénico viral para romper los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la captación y expresión específicas de células, dirigiéndose a un receptor específico (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/06180, WO 92/22635, W092/20316, W0 93/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación homóloga (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 y Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435-438).

En un caso específico, se utilizan vectores virales que contienen 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 et al., 1993, Meth. Enzymol., 217: 581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el envasado correcto 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 a utilizar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Se puede encontrar más detalle sobre los vectores retrovirales en Boesen et al., (1994, Biotherapy 6: 291-302), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93: 644-651; Klein et al., 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky and Wilson (Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503, 1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al. (Human Gene Therapy, 5: 3-10, 1994) demostraron el uso de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de los monos Rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld et al., 1991, Science 252: 431-434, Rosenfeld et al., 1992, Cell 68: 143-155, Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91: 225-234, publicación PCT W094/12649 and Wang et al., 1995, Gene Therapy 2: 775-783. En un caso preferido, se utilizan vectores de adenovirus.

También se ha propuesto el uso de un virus adenoasociado (AAV) para su uso en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 y Patente de los Estados Unidos No.5,436,146).

Otro enfoque de la terapia génica implica la transferencia de un gen a células en cultivo de tejidos mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. A continuación, las células se colocan bajo selección para aislar aquellas células que han tomado y están expresando el gen transferido. Estas células se administran entonces a un sujeto.

En este caso, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia de genes micromediados, fusión de esferoplastos, etc. Numerosas técnicas son conocidas en la técnica para la introducción de genes extraños en células (véase, por ejemplo, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol, 217: 599-618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol., 217: 618-644, and Clin. Pharma, Ther. 29: 69-92, 1985) y pueden usarse, 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 preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden suministrar a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células progenitoras o hematopoyéticas) se

administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para el uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

5 Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible, e incluyen pero no se limitan 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, en particular células progenitoras o hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En un caso preferido, la célula utilizada para la terapia génica es autóloga al sujeto.

10 En un caso en el 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 tal manera que son expresables por las células o su progenie y las células recombinantes se administran entonces *in vivo* para efecto terapéutico. En una realización específica, se utilizan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitor que pueda ser aislada y mantenida *in vitro* puede usarse potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente invención (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 7 1: 973-985, Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A: 229, y Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61: 771).

En un caso específico, el ácido nucleico que se va a introducir con fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico es controlable controlando la presencia o ausencia del inductor apropiado de transcripción.

20 5.6.3 Kits

La divulgación proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con las moléculas de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes). Además, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también se pueden incluir en el paquete o kit farmacéutico. La descripción también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con dicho(s) contenedor(es) puede ser una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

30 La presente divulgación proporciona kits que se pueden usar en los métodos anteriores. En un caso, un kit comprende una o más moléculas de la invención. En otro caso, un kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otro caso, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. En ciertos casos, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quimioterapéutico. En otros casos, el agente profiláctico o terapéutico es un terapéutico biológico u hormonal.

35 5.7 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, profilácticos o agentes terapéuticos de la invención se prueban preferiblemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular y en un organismo modelo animal, tal como un sistema modelo animal de roedor, para la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido de paciente se hace crecer en cultivo y se expone o se pone en contacto de otra manera con una composición farmacéutica de la invención, se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de las moléculas profilácticas o terapéuticas más eficaces terapéuticamente para cada paciente individual. En diversos casos específicos, pueden realizarse ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno autoinmune o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células.

Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden ensayarse en sistemas de modelo animal adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En un caso específico, se ensayan combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema modelo de ratón. Tales sistemas modelo son ampliamente utilizados y bien conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos se pueden administrar repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran por separado o como una mezcla.

Modelos animales preferidos para su uso en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγRs humano en células efectoras de ratón, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en el

documento US 5,877,396 puede usarse en la presente invención. Los ratones transgénicos para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, ratones que portan Fc γ R1IIIA humano; ratones que llevan Fc γ R1IIA humano; ratones que llevan Fc γ R1IIB humano y Fc γ R1IIIA humano; ratones que llevan Fc γ R1IIB humano y Fc γ R1IIA humano.

- 5 Preferentemente, las mutaciones que muestran los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se someterán a ensayo para su uso en estudios en modelos animales antes de su uso en seres humanos. Los anticuerpos que albergan los mutantes Fc identificados usando los métodos de la invención y ensayados en ensayos de ADCC, incluyendo ch4D5 y ch520C9, dos anticuerpos anti-Erb-B2 y chCC49, un anticuerpo anti-TAG72, son preferidos para uso en modelos animales ya que se han utilizado previamente en un modelo de ratón de xenoinjerto (Hudsiak et al., 1989, Mol. Cell Biol. 9: 1165-72, Lewis et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother., 37: 255-63, Bergman et al., 2001 Clin. Cancer Res. 7: 2050-6, Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 1387-93). Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en modelos animales usando métodos descritos anteriormente, por ejemplo usando sistemas de expresión de mamíferos y métodos de purificación de IgG descritos y ejemplificados en el presente documento. Un experimento típico requiere al menos aproximadamente 5.4 mg de anticuerpo mutante. Este cálculo se basa en cantidades medias de anticuerpos de tipo salvaje requeridos para proteger 8-10 ratones 30 g después de una dosis de carga de 4 μ g/g y una dosis de mantenimiento semanal, 2 μ g/g, durante diez semanas. La invención abarca líneas de células tumorales como fuente de tumores de xenoinjerto, tales como células SK-BR-3, BT474 y HT29 que se derivan de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen Erb-B2 y los receptores de prolactina en su superficie. Las células SK-BR-3 se han utilizado con éxito tanto en ADCC como en modelos de tumor de xenoinjerto. En otros ensayos se pueden usar células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano. Estas células expresan el antígeno TAG72 sobre la superficie celular y pueden usarse conjuntamente con el anticuerpo chCC49. El uso de diferentes anticuerpos y modelos tumorales múltiples evitará la pérdida de cualquier mutación específica debido a una incompatibilidad mutante Fc específica de anticuerpo.
- 10 Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de anticuerpos de ratón generados contra una diana específica de tumor basándose en la afinidad y 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 et al., 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan Fc γ Rs humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales hechos a medida para probar la eficacia de las interacciones Fc-Fc γ R humanas.
- 15 Pueden utilizarse pares de líneas transgénicas de ratón Fc γ R1IIIA, Fc γ R1IIB y Fc γ R1IIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y el centro de cáncer Sloan Kettering) tales como las enumeradas en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Cepas de ratones

Antecedentes de la cepa	FcR humano
Desnudo/CD16A KO	ninguna
Desnudo/CD16A	Fc γ R1IIIA
Desnudo/CD15A KO	Fc γ R1IIA
Desnudo/CD16A KO	Fc γ R IIA y IIIA
Desnudo/CD32B KO	ninguna
Desnudo/CD32B KO	Fc γ R1IIB

- 35 Preferiblemente, se ensayan mutantes Fc que muestran tanto la unión mejorada a Fc γ R1IIIA como la reducción de la unión a Fc γ R1IIB, el aumento de la actividad en ensayos de ADCC y fagocitosis en experimentos con modelos animales. Los experimentos con modelos animales examinan el aumento de la eficacia de los anticuerpos que portan mutantes Fc en ratones con supresión genética transgénicos, desnudos mCD16A de Fc γ R1IIIA en comparación con un control que se ha administrado con anticuerpos nativos. Preferiblemente, los grupos de 8-10 ratones se examinan usando un protocolo estándar. Un experimento de ejemplo de modelo animal puede comprender las siguientes etapas: en un modelo de cáncer de mama, se inyectan $\sim 2 \times 10^6$ células SK-BR-3 subcutáneamente al día 1 con 0.1 mL de PBS mezclado con Matrigel (Becton Dickinson). Inicialmente se administra un anticuerpo quimérico de tipo salvaje y control de isotipo para establecer una curva para la dosis terapéutica predeterminada, inyección intravenosa de 4D5 el día 1 con una dosis inicial de 4 μ g/g seguida de inyecciones semanales de 2 μ g/g. El volumen del tumor se controla durante 6-8 semanas para medir el progreso de la enfermedad. El volumen tumoral debe aumentar linealmente con el tiempo en animales inyectados con el control de isotipo. En contraste muy poco crecimiento tumoral debe ocurrir en el grupo de inyección con 4D5. Los resultados del estudio de dosis estándar se usan para establecer un límite superior para experimentos que prueban los

mutantes Fc. Estos estudios se realizan utilizando dosis subterapéuticas del mutante Fc que contiene anticuerpos. Se utilizó una décima dosis en modelos de xenoinjerto en experimentos realizados en ratones con supresión genética Fc γ RIIB, véase, Clynes et al., 2000, Nat. Medicina. 6: 4.43-6, con un bloque resultante en el crecimiento de células tumorales. Dado que los mutantes de la invención muestran preferiblemente un aumento en la activación de Fc γ RIIA y reducción en la unión de Fc γ RIIB, los mutantes se examinan con una décima dosis terapéutica. El examen del tamaño del tumor a intervalos diferentes indica la eficacia de los anticuerpos a la dosis más baja. El análisis estadístico de los datos utilizando la prueba t proporciona una forma de determinar si los datos son significativos. Fc mutantes que muestran una mayor eficacia se ensayan a dosis incrementalmente más bajas para determinar la dosis más pequeña posible como una medida de su eficacia.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención puede determinarse utilizando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoinmunidad en Animales", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al. (eds.), capítulo 30 (Lee and Febiger, 1993). También se pueden usar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no por limitación.

Los modelos animales principales para la artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente utilizados incluyen: modelos de ratas de artritis inducida por adyuvante, modelos de ratas y ratones de artritis inducidos por colágeno y modelos de ratas, conejos y hámsteres de artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al. (eds.), capítulo 30 (Lee and Febiger, 1993).

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención se puede evaluar usando un modelo de rata de artritis inducido por carragenano. La artritis inducida por carragenano también se ha utilizado en conejos, perros y cerdos en estudios de artritis crónica o inflamación. La evaluación histomorfológica cuantitativa se utiliza para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar este modelo de artritis inducida por carragenano se describen en Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24 (2): 141-155, (2000). También se usan habitualmente modelos animales de inflamación inducida por zimosan como se conocen y describen en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención puede evaluarse también midiendo la inhibición del edema de pata inducido por carragenano en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C.A. et al., "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 ha utilizado como una criba primaria *in vivo* para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera un factor predictivo de la eficacia humana. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos de ensayo se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo de ensayo con respecto al grupo de control dosificado con vehículo.

Además, también se pueden utilizar modelos animales para la enfermedad inflamatoria intestinal para evaluar la eficacia de las terapias de combinación (Kim et al., 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 intestinales inflamatorias humanas que pueden ser inducidas en animales. Los polisacáridos sulfatados que incluyen pero no limitados a amilopectina, carragenato, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos que incluyen pero no se limitan a ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a animales oralmente para inducir enfermedades inflamatorias intestinales.

También se pueden utilizar modelos animales para trastornos autoinmunes para evaluar la eficacia de las terapias de combinación. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunes tales como la diabetes tipo 1, la autoinmunidad tiroidea, el lupus eritematoso sistémico y la glomerulonefritis (Flanders et al., 1999, *Autoimmunity* 29: 235-246, Krogh et al., 1999, *Biochimie* 81: 511-515, Foster, 1999, *Semin. Nephrol.*, 19: 12-24).

Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica puede usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias descritas en el presente documento para enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de administración que dirige dichos agentes al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y los estudios con animales pueden usarse para formular una gama de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

La actividad anticancerosa de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención también se puede determinar usando varios modelos animales experimentales para el estudio de cáncer tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, etc., conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, ediciones Fiebig and Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997, Teicher).

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 fuente de tumores de xenoinjerto incluyen, pero sin limitación, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto los receptores erbB2 como los receptores de prolactina. Las células SKBR3 se han utilizado rutinariamente en la técnica como ADCC y modelos de tumor de xenoinjerto. Alternativamente, se pueden usar células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano como fuente de tumores de xenoinjerto.

Los protocolos y composiciones de la invención se prueban preferiblemente *in vitro*, y luego *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes terapéuticos y los métodos pueden ser seleccionados utilizando células de un tumor o una línea celular maligna. Muchos ensayos estándar en la técnica pueden usarse para evaluar tal supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, se puede ensayar la proliferación celular midiendo la incorporación de ³H-timidina, por recuento directo de células, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores de ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse mediante tinción con azul de tripano, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en cambios en la morfología, disminución del crecimiento y/o formación de colonias en agar blando o formación de red tubular en una preparación tridimensional de la membrana basal o matriz extracelular, etc.

Los compuestos para uso en terapia pueden ensayarse en sistemas modelo animales adecuados antes de ensayar en seres humanos, incluyendo pero no limitándose a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos pueden utilizarse entonces en los ensayos clínicos apropiados.

Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica puede usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias descritas en el presente documento para el tratamiento o prevención de cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmune.

6. Ejemplos

Utilizando un sistema de despliegue en levaduras, las regiones Fc de la cadena pesada de IgG1 humano mutante se seleccionaron para afinidad modificada a diferentes receptores Fc. En particular, se generó una genoteca de Fc mutante por PCR propensa a error (Genemorph, Stratagene), y luego se fusionaron las proteínas Fc mutantes con la proteína de pared celular Aga2p, lo que permitió que la proteína de fusión fuera secretada extracelularmente y presentada en la pared celular de levadura.

Se clonaron formas solubles de los receptores humanos (Fc_γRIIIA y Fc_γRIIB). Sin embargo, la detección de los dominios Fc de IgG1 en la superficie de la célula de levadura se ve obstaculizada debido a la baja afinidad de Fc_γR por su ligando. Con el fin de eludir esta limitación, se formaron complejos tetraméricos Fc_γR solubles usando una secuencia AVITAG que podría ser biotinilada enzimáticamente y posteriormente reaccionada con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SA-PE, Molecular Probes) para formar complejos tetraméricos Fc_γR solubles. Los ensayos ELISA confirmaron que los complejos tetraméricos Fc_γR solubles tenían una mayor avidéz para la IgG1 humana con respecto a la Fc_γR monomérica. Las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura también se unieron a los complejos tetraméricos Fc_γR solubles, según se evaluó mediante análisis FACS.

La unión diferencial de las proteínas de fusión Fc expresadas en la superficie de la célula de levadura a complejos Fc_γR tetraméricos solubles se controló mediante un análisis FACS. Las proteínas de fusión Fc con afinidades alteradas para uno o más complejos Fc_γR tetraméricos solubles se identificaron así y se incorporaron a continuación en una inmunoglobulina completa y se expresaron en células de mamífero. El producto expresado de mamífero se

usó en ensayos ELISA para confirmar los resultados obtenidos en el sistema de despliegue en superficie de levadura. Finalmente, se secuenciaron las regiones Fc mutantes para confirmar el(los) residuo(s) alterado(s).

6.1 Clonación, expresión y purificación de Fc γ R1IIIA

Materiales y métodos

5 Se clonaron Fc γ R1IIB y Fc γ R1IIIA solubles como sigue. Se obtuvieron los clones de ADNc para los genes Fc γ R humanos (Fc γ R1IIB y Fc γ R1IIIA) (obsequio de Ravetch Lab.). La región soluble del gen Fc γ R1IIIA (aminoácidos 7-203) se amplificó mediante PCR (Tabla 12), se digirió con BamHI/HindIII y se ligó al vector pET25 (Novagen). Este vector se digirió con SalI/NotI y se aisló un fragmento de 370 por fragmento. El vector hu3A, (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/SalI y se aisló un 270 por fragmento que contenía el extremo N de Fc γ R1IIIA. Ambos fragmentos fueron coligados en pcDNA3.1 cortado con BamH/NotI para crear pcDNA3-Fc γ R1IIIA (aminoácidos 1-203). La región soluble de Fc γ R1IIB (aminoácidos 33-180) se amplificó mediante PCR (Tabla 12), se digirió con BglII/HindIII y se ligó en pET25b(+) (Novagen). Este vector se digirió con BamHI/NotI y se aisló en gel un fragmento de 140 pb. El vector huR1Ib1 (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI y se aisló un fragmento Fc γ R1IIB N-terminal de 440 pb. Ambos fragmentos fueron coligados en pcDNA3.1 cortado con BamHI/NotI para crear pcDNA3-Fc γ R1IIB (aminoácidos 1-180). Los clones recombinantes se transfectaron en células 293H, se recogieron los sobrenadantes de cultivos celulares y se purificaron proteínas Fc γ R (rFc γ R) recombinantes solubles en una columna de IgG Sepharose.

Resultados

20 El Fc γ R1IIIA soluble recombinante (rFc γ R1IIIA) y el Fc γ R1IIB soluble recombinante (rFc γ R1IIB) se purificaron a homogeneidad

Después de la expresión y purificación de las proteínas Fc γ R solubles recombinantes en una columna de IgG Sepharose, se determinó la pureza y el peso molecular aparente de las proteínas receptoras solubles purificadas recombinantes mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 1, el rFc γ R1IIIA soluble (figura 1, carril 1) tenía el peso molecular aparente esperado de ~35KDa y el rFc γ R1IIB soluble (figura 1, carril 4) tenía el peso molecular aparente esperado de ~20KDa. Como se muestra en la figura 1, el rFc γ R1IIIA soluble migra como una banda difusa "borrosa" lo que se ha atribuido al alto grado de glicosilación normalmente encontrado en Fc γ R1IIIA (Jefferis et al., 1995, Immunol Lett., 44, 111-117).

6.1.1 Caracterización del Fc γ R1IIIA soluble recombinante purificado

Materiales y métodos

30 Se analizó la rFc γ R1IIIA soluble purificada, que se obtuvo como se describió anteriormente, para la unión directa contra el IgG monomérico o agregado humano usando un ensayo ELISA. La placa se reviste con 10 ng de rFc γ R1IIIA soluble durante una noche en PBS 1X. Después del revestimiento, la placa se lava tres veces en 1X PBS/0.1% de Tween 20. Se añade IgG humana, ya sea IgG monomérica biotinilada o IgG agregada biotinilada a los pozos a una concentración que varía de 0.03 mg/mL a 2 mg/mL, y se le permitió unirse a la rFc γ R1IIIA soluble. La reacción se lleva a cabo durante una hora a 37°C. La placa se lava nuevamente tres veces con 1X PBS/Tween 20 al 0.1%. La unión de IgG humana a rFc γ R1IIIA soluble se detecta con conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano picante mediante el control de la absorbancia a 650 nm. La absorbancia a 650 nm es proporcional a la IgG agregada unida.

40 En un experimento ELISA de bloqueo, se controla la capacidad de un anticuerpo monoclonal Fc γ R1IIIA, 3G8, un anticuerpo anti-Fc γ R1IIIA de ratón (Pharming), para bloquear la unión del receptor a IgG agregada. Las condiciones de lavado e incubación fueron las mismas que las descritas anteriormente, excepto que antes de la adición de IgG, se añadió un exceso molar de 5 veces de 3G8 y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C.

Resultados

El Fc γ R1IIIA soluble recombinante purificado se une específicamente a las IgG agregadas

45 Se probó la unión directa de Fc γ R1IIIA soluble recombinante purificado a IgG agregada y monomérica usando un ensayo ELISA (figura 2). A una concentración de IgG de 2 μ g/ml, se observó fuerte unión a la IgG agregada. Sin embargo, a una concentración similar, no se detectó unión a la IgG monomérica. La unión a IgG agregada fue bloqueada por 3G8, un anticuerpo monoclonal anti-Fc γ R1IIIA de ratón que bloquea el sitio de unión al ligando, indicando que la unión de IgG agregada es a través de la del sitio de unión al ligando Fc γ R1IIIA normal (figura 2). El rFc γ R1IIB soluble se caracterizó también y se demostró que se unía a IgG con características similares a las del rFc γ R1IIIA soluble (datos no mostrados).

6.2 Formación de complejos tetraméricos solubles de FcR γ

Materiales y métodos

Construcción de plásmidos para la expresión de FcR γ IIIA soluble y FcR γ IIB fusionado al péptido AVITAG.

Para generar complejos tetraméricos solubles en Fc γ R, la región soluble del gen FcRgIIIA humano (aminoácidos 7-203) se amplificó mediante PCR (Tabla 12), se digirió con BamHI/HindIII y se ligó en el pET25b(+) (Novagen). Este vector se digirió con Sall/NotI, y se aisló un fragmento de 370 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector hu3A, (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/Sall, y se aisló un fragmento de 270 pb que contenía el extremo N de FcR γ IIIA. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 (Invitrogen), que se había digerido con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcRgIIIA (aminoácidos 1- 203).

La región soluble de FcR γ IIB (aminoácidos 33-180) se amplificó mediante PCR (Tabla I), se digirió con BgIII/HindIII y se ligó en pET25b(+) (Novagen). Este vector se digirió con BamHI/NotI, y se aisló un fragmento de 140 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector huRIIb₁ (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI, y se aisló un fragmento N-terminal de 440 por FcR γ IIB. Ambos fragmentos fueron coligados en pcDNA3.1, que había sido digerido con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcR γ IIB (aminoácidos 1-180). Posteriormente, la secuencia enlazador-AVITAG se fusionó al extremo C-terminal tanto de Fc γ RIIIA como de Fc γ RIIB. Para generar las construcciones Fc γ RIIIA-Linker-Avitag y Fc γ RIIB-Linker-Avitag, las construcciones pcDNA3.1 Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB se digirieron con Not I y XbaI (ambos cortados en la secuencia del vector) y una cadena doble de 86 pares de bases oligonucleótido consistente en sitio NotI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3' se ligó en el vector. Este fragmento de 86 pb se generó recociendo dos oligonucleótidos 5' complementarios inversos fosforilados (mostrados en la Tabla 12 como cebadores de enlace 5' y 3' de enlace) con los sitios de restricción para NotI y XbaI ya prediseñados. Se mezclaron volúmenes iguales de cada cebador a 100 ng por μ l y el ADN se calentó a 90°C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante una hora para hibridarse. Esto creó un fragmento de ADN de doble cadena listo para ser ligado a las construcciones pcDNA3.1-Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB digeridas con las enzimas respectivas. Por lo tanto, se construyeron pcDNA3.1-FcR γ IIIA-Linker-AVITAG y pcDNA3.1-FcR γ IIB-Linker-AVITAG.

Tabla 12: Cebadores utilizados para la construcción de Fc γ R y vectores de IgG

Oligómeros	Secuencias
5' linker.avitag (SEQ. ID NO. 1)	GGCCGCAGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTCTGAACGACATCTT CGAGGCTCAGAAAA TCGAATGGCACGAATGAT
3' linker.avitag (SEQ. ID NO. 2)	CTAGATCATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCAG AACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGC
FcRIIIA izquierdo (SEQ. ID NO. 3)	G TTG GAT CCT CCA ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT T
FcRIIIA derecho (SEQ. ID NO. 4)	GAA AAG CTT AAA GAA TGA TGA GAT GGT TGA CAC T
FcRIIBderecho (SEQ.ID NO. 5)	GAA GTC GAC AAT GAT CCC CAT TGG TGA AGA G
FcRIIBizquierdo (SEQ.ID NO. 6)	G TTA GAT CTT GCT GTG CTA TTC CTG GCT CC
IgG1 derecho (SEQ.ID NO. 7)	ATA GTC GAC CAC TGA TTT ACC CGG AGA
IgG1izquierdo (SEQ. ID NO. 8)	GGAA TTC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT
mcr025;chl (f) (SEQ. ID NO. 9)	AAA GGATCC GCG AGC TCA GCC TCC ACC AAG G
H021 (SEQ. ID NO. 10)	GTCTGCTCGAAGCATTAACC

Biotinilación por BirA

Se generaron receptores Fc solubles (Fc γ R) fusionados a la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos (Avidity, CO) (Schatz PJ, 1993, Biotechnology, 11: 1138-1143) en el extremo C-terminal de la proteína clonada en pcDNA3.1 transfectando transitoriamente células 293H usando reactivo de lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA). Los sobrenadantes se recogieron de los cultivos y las proteínas FcR solubles se purificaron pasando los sobrenadantes sobre una columna de Sepharose IgG. La concentración de la proteína de fusión FcR-AVITAG soluble se cuantificó por absorbancia a 280 nm. La AVITAG presente en las proteínas FcR soluble se biotiniló de acuerdo con el protocolo del fabricante (Avidity, CO) con la enzima BirA de *E. coli*, una biotina ligasa. Se añadió a la mezcla una dilución final de 1:100 de un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma catálogo #P8849) y concentración final de 1 mg/ml de Leupeptina (Sigma L-8511) para evitar la degradación de las proteínas. La reacción de BirA se incubó a temperatura ambiente durante la noche, después de lo cual la solución se concentró utilizando un dispositivo Biomax 10K de filtración (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), NaCl 50 mM para separar el Fc γ R soluble marcado de biotina libre.

Determinación del grado de biotinilación mediante el ensayo de desplazamiento de estreptavidina

Aproximadamente 80-85% de la proteína fue biotinilada por la enzima BirA (Avidity, CO). El ensayo de cambio de estreptavidina se usó para determinar el grado de biotinilación de la proteína. La proteína biotinilada se incubó con estreptavidina (PM 60.000 Daltons) en diferentes proporciones. La proteína no biotinilada sola y la estreptavidina sola se incluyen como controles para determinar el grado de biotinilación. La incubación se lleva a cabo en hielo durante 2 horas o durante la noche a 4°C. Las muestras se analizan en un 4-12% SDS-PAGE Bis-Tris (Invitrogen, CA) con agente reductor y sin ebullición de las muestras. La proteína biotinilada unida a estreptavidina migra como una banda de alto peso molecular. El grado de biotinilación se estima por la cantidad de proteína monomérica que queda en la muestra. La ausencia de especies monoméricas de bajo peso molecular y la presencia de un complejo con un peso molecular mayor que la estreptavidina sola indica un alto grado de biotinilación.

Formación de complejos tetraméricos de Fc γ R

La formación de complejos tetraméricos de Fc γ R se realizó de acuerdo con metodologías previamente establecidas para los tetrámeros del MHC de clase I (véase Busch, D.H. et al. 1998, Immunity 8: 353-362, Altman, J.D. et al., 1996, Science 274: 94-96). La concentración del Fc γ R monomérico biotinilado se calculó sobre la base de 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. Se usó una proporción molar 5:1 de Fc γ R monomérico a SA-PE (Fc γ R: 1X SA-PE biotinilado monomérico 5X) 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 nmols de proteína. La formación eficiente de la proteína tetramérica requiere que SA-PE sea añadido en incrementos escalonados. Se añadió por adelantado la mitad de la cantidad de SA-PE y se añadió el SA-PE restante en pequeñas alícuotas cada 20-30 minutos a 4°C en la oscuridad. Los intervalos para la adición del resto de SA-PE son flexibles. Después de completar la adición de SA-PE, la solución se concentró y se cargó sobre una columna de exclusión de tamaño FPLC como se ha descrito anteriormente en solución salina regulada con fosfato, a pH 7.4. La fracción que se eluyó en el volumen vacío con un peso molecular mayor que SA-PE solo se recogió. Los inhibidores de la proteasa se reabastecieron para prevenir la degradación de la proteína. La solución se concentró y se añadieron inhibidores adicionales de proteasa al complejo final para el almacenamiento. La concentración final del complejo tetramérico soluble en Fc γ R se calculó sobre la base de la concentración de partida de la proteína monomérica biotinilada. Por ejemplo, si se usaron 500 μ g de proteína biotinilada para fabricar el complejo tetramérico y los tetrámeros concentrados finales en un volumen de 500 μ l, se estima que la concentración es de aproximadamente 1 mg/ml (las pérdidas sufridas durante la concentración no se toman en cuenta dado que es difícil determinar exactamente cuánto se pierde durante cada paso de la formación de los tetrámeros, y tampoco es posible tomar una absorbancia a 280 nm para medir la concentración debido a la interferencia del PE). Los complejos tetraméricos Fc γ R solubles se dispensaron en pequeñas alícuotas a -80°C para almacenamiento a largo plazo con inhibidores de proteasa. No se añadió azida de sodio a estas preparaciones ya que los tetrámeros se usaron para cribar una biblioteca de exposición de levaduras. Al descongelar una alícuota, los tetrámeros se almacenaron a 4°C durante hasta 1 semana.

Ensayo ELISA para caracterizar los complejos tetraméricos Fc γ R

Se utilizó un ELISA para caracterizar los complejos Fc γ R tetraméricos. Se recubrió la placa de pozos Maxisorb F96 (Nunc) con 25 ng de IgG humana en regulador PBS, y se incubó durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS/BSA al 0.5%/Tween 20 al 0.1% (regulador de lavado y diluyente) antes de añadir la combinación de tetrámeros Fc γ R/III A y anticuerpos de prueba para determinar el bloqueo con 3G8, un anticuerpo Fc γ R/III A de ratón anti-humano como se describe: La etapa de bloqueo se realizó de la siguiente manera: se preincubaron los tetrámeros Fc γ R/III A solubles a una concentración final de 0.5 mg/ml con anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente en regulador,

5 PBS/BSA al 0.5%/Tween 20 al 0.1%. Las concentraciones finales de los anticuerpos oscilaron entre 60 mg/mL y 0.25 mg/mL. 3G8 es un anticuerpo Fc γ R111A anti-humano de ratón, y para los fines de este experimento se utilizó una versión quimérica, es decir, la región variable del anticuerpo es un Fc γ R111A de ratón antihumano y la región constante de la cadena pesada y cadenas ligeras procede de la región humana IgG1. Un quimérico 4.4.20. D265A también se usó en este experimento, que es un anticuerpo antiluoresceína, de tal manera que la región Fc contiene una mutación en la posición 265, donde un ácido aspártico está sustituido con alanina en la IgG1 humana, lo que da como resultado una unión reducida a Fc γ R. Este anticuerpo se ha caracterizado previamente (véase Clynes et al., 2000, Nat. Med. 6: 443-446, Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276: 6591-6604). Este anticuerpo se usó como control de isotipo negativo.

10 Se dejó que los anticuerpos se unieran a tetrámeros de Fc γ R111A, por preincubación durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se añadió a la IgG en la placa lavada y se incubó durante una hora adicional a temperatura ambiente. La placa se lavó con regulador y se añadió DJ130c (un anticuerpo anti-Fc γ R111A de ratón disponible de DAKO, Dinamarca; cuyo epítipo es distinto del anticuerpo 3G8) a una dilución de 1:5000 y se dejó incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de detectar los tetrámeros de Fc γ R111A unidos. Los anticuerpos no unidos se lavaron con regulador y se detectó el DJ130c unido con peroxidasa antirratón de cabra (Jackson Laboratories). Este reactivo no detectará la Fc humana. Después de lavar el anticuerpo conjugado con peroxidasa no unido, se añadió el sustrato, reactivo TMB (BioF \times) para detectar el grado de bloqueo con 3G8 frente al control de isotipo y se leyó el color desarrollado a 650 nm.

20 Para la unión directa de Fc γ R111A tetramérico soluble a IgG por ELISA, se recubrieron placas de Maxisorb con 25 ng de IgG como se ha descrito anteriormente. Se añadieron el Fc γ R111A tetramérico soluble de 20 mg/mL a 0.1 mg/mL y el Fc γ R111A tetramérico soluble monomérico biotinilado se añadió a concentraciones que oscilaban entre 20 mg/mL a 0.16 mg/mL. La detección fue la misma que la anterior con DJ130c, seguido por anticuerpo de cabra antirratón peroxidasa. Se desarrolló un color con el reactivo TMB y se leyó la placa a 650 nm.

Resultados

25 El complejo tetramérico Fc γ R111A soluble se une a la IgG humana monomérica a través de su sitio de unión al ligando normal

30 Se generaron, aislaron y analizaron las proteínas de fusión solubles de Fc γ R111A-AVITAG, como se describe en la sección de Material y Métodos usando un ensayo ELISA y se demostró que tenían propiedades similares a la proteína Fc γ R111A soluble no AVITAG (datos no mostrados). Las proteínas de fusión se biotinilaron, y los complejos tetraméricos se generaron como se ha descrito anteriormente.

35 A continuación se evaluó el complejo tetramérico Fc γ R soluble para unir su ligando monomérica de IgG humana, usando un ensayo ELISA. El análisis por ELISA mostró que los complejos de Fc γ R tetraméricos solubles se unen específicamente a IgG humana monomérica. Como se muestra en la figura 3A, la unión de Fc γ R111A tetramérico soluble a IgG humana monomérica está bloqueada por 3G8, un anticuerpo monoclonal de ratón Fc γ R111A antihumano, según se monitoriza por la absorbancia a 650 nm. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que alberga la mutación D265A no fue capaz de bloquear la unión de Fc γ R111A tetramérico soluble a IgG monomérica humana (figura 3A). Este experimento confirma así que la unión del complejo tetramérico Fc γ R111A soluble ocurre a través del sitio de unión del ligando nativo.

40 El complejo tetramérico Fc γ R111A soluble se une a la IgG humana monomérica con una mayor avidéz que la Fc γ R111A soluble monomérica

Se determinó la unión directa de Fc γ R111A tetrámera soluble a IgG humana agregada usando un ensayo ELISA y se comparó con la unión directa de Fc γ R111A monomérico soluble a IgG humana monomérica. Como se muestra en la figura 3B, el Fc γ R111A tetramérico soluble se une a la IgG humana con una mayor avidéz (8-10 veces) que el receptor monomérico soluble, según se monitoriza por la absorbancia a 450 nm.

45 La unión del complejo tetramérico Fc γ R111A soluble se ensayó también usando perlas magnéticas recubiertas con fragmento Fc purificado a partir de IgG1 (figura 4). El complejo tetramérico Fc γ R111A soluble se une a las perlas recubiertas de IgG1 Fc, bajo condiciones en las que no se detecta la unión de monómero. La especificidad de la unión se demostró mediante la preincubación del complejo receptor, con un anticuerpo monoclonal anti-Fc γ R111A, LNK16, que bloquea la unión a Fc. Este ensayo confirma además que el complejo tetramérico Fc γ R111A soluble se une a la IgG monomérica a través de su sitio de unión al ligando normal, y la avidéz del receptor aumenta debido a múltiples sitios de unión dentro del complejo.

6.3 Construcción de la cepa de levadura para el despliegue de los dominios mutantes IgG1 Fc

Materiales y métodos

El vector pYD1 (Invitrogen) se deriva directamente de un vector de replicación de levadura pCT302 (Shusta et al.,

2000 Nat. Biotechnol., 18: 754-759, que se ha utilizado con éxito para mostrar los receptores de células T y un cierto número de scFV. 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 *trp1*. La clonación direccional en el polligador coloca el gen de interés bajo el control del promotor GAL1 y en el marco con AGA 2. La fusión del dominio Fc IgG a la levadura Aga2p resulta en la secreción extracelular de la proteína de fusión Aga2-Fc y la visualización subsiguiente de la proteína Fc en la pared celular a través de la unión disulfuro a la proteína Aga Ip de levadura, que es una proteína integral de la pared celular.

Con el fin de optimizar los niveles de visualización, se amplificaron por PCR diferentes fragmentos de la cadena pesada de IgG1 y se clonaron en pYD1. Específicamente, la región Fc de la cadena pesada de IgG1 (alotipo IG1m(a), aminoácidos 206-447) se amplificó mediante PCR (Tabla 1) del clon IMAGE 182740, se digirió con EcoRI/Sall y se ligó al vector pYD1 (Invitrogen). El clon inicial de IMAGE contenía una eliminación de un solo nucleótido en la posición 319 que se corrigió por mutagénesis dirigida *in vitro* para construir pYD-GIF206 (Quickchange, Stratagene).

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 la Tabla 8). El fragmento se digirió con BamHI/NotI y se ligó al vector pYD1 para construir pYD-CH1.

La figura 5 muestra una presentación esquemática de los constructos. El constructo CH1-CH3 contiene el dominio CH1 además de los dominios bisagra-CH2-CH3 de la cadena pesada, GIF206 contiene 6 residuos aminoácidos corriente arriba de la bisagra y GIF227 comienza dentro de la región bisagra en un sitio endógeno de escisión proteolítica (Jendeberg et al. 1997, J. Immunol, Meth. 201: 25-34).

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

Materiales y métodos

Se transformaron constructos que contenían las proteínas de fusión Aga2p-Fc y un vector de control, pYDI, sin inserto alguno, en la cepa de levadura EBY100 (Invitrogen), MATa *ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL::GAL-AGA1*, utilizando un protocolo de transformación de levadura de acetato de litio estándar (Gietz et al., 1992 Nucleic Acids Res. 20: 1425). Posteriormente, los prototróficos de triptófano se seleccionaron en medios definidos. La amplificación de las poblaciones de células independientes y la inducción de Agalp y las proteínas de fusión Aga2p-Fc se llevaron a cabo mediante crecimiento en glucosa, seguido por crecimiento en medio que contenía galactosa como fuente de carbono primario 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 conduce posteriormente a la visualización de las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura.

Resultados

Análisis FACS de proteínas Fc de fusión

La expresión de las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura se analizó mediante inmunotinción utilizando un anticuerpo Fc γ R y HP6017 (Sigma) anti-humano de cabra anti-humano conjugado con PE (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). La microscopía de fluorescencia muestra tinción periférica para las tres proteínas de fusión Fc. La cepa de control, que alberga el vector solo, muestra poca o ninguna tinción (datos no mostrados). El análisis FACS se usó para cuantificar la tinción (figura 6). La cepa de levadura que contiene la fusión CH1-CH3 demostró el mayor porcentaje de células teñidas con ambos anticuerpos (figuras 6B y F). La construcción GIF227 mostró la mayor intensidad media de fluorescencia (figura 6, paneles C y G).

Caracterización de la unión de las proteínas Fc de fusión expresada en la superficie celular de levadura

El contexto natural de las proteínas Fc y Fc γ R coloca el receptor en la superficie celular y el Fc como el ligando soluble; sin embargo, la superficie de la levadura Fc invierte la geometría de la interacción natural. La detección de las proteínas IgG1 Fc sobre la superficie de la pared celular de levadura es complicada tanto por la baja afinidad del Fc γ R por su ligando como por la geometría inversa inherente al sistema de visualización. Aunque este último punto no puede alterarse, la avidéz del ligando se mejoró como se ha explicado anteriormente mediante la formación de complejos tetraméricos Fc γ R solubles, lo que permite la detección de la unión de Fc γ R a las proteínas de fusión Fc expresadas en la pared celular superficial de la levadura.

Para caracterizar la unión de complejos Fc γ R tetraméricos solubles a las proteínas de fusión Fc mostradas en la superficie, se incubaron células de levadura que expresan diferentes construcciones Fc con el complejo tetramérico rFc γ RIIIA soluble y se analizaron mediante FACS. Las células de levadura que albergan pYD-CH1, que muestran la construcción CH1-CH3 de tipo salvaje, se unieron mediante el complejo tetrámero rFc γ RIIIA soluble como se muestra por análisis FACS. Las cepas GIF206 y GIF227, sin embargo, mostraron poca o ninguna unión al complejo tetrámero rFc γ RIIIA soluble como se muestra por análisis FACS (datos no mostrados).

Se han identificado mutaciones en la región Fc que bloquean la unión a los Fc γ Rs (Shields et al., 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 de la célula de levadura. Estas células se incubaron con el complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble usando una concentración elevada de ligando (0.15 mM de Fc; 7.5 mM de D265A). El análisis FACS indicó que el complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble se unió al Fc de tipo salvaje (figura 7A) pero el complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble no se unió al mutante D265A-Fc, indicando que Fc γ R está interaccionando con el sitio de unión FcR normal en la región CH2 bisagra inferior (figura 7B).

Los anticuerpos contra el sitio de unión al ligando Fc γ R1IIIA bloquearon la unión del complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble a la proteína Fc de tipo salvaje mostrada en la pared de la superficie de la célula de levadura, analizada por FACS (figura 8). La unión del complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble se bloqueó mediante el anticuerpo 3G8, así como el anticuerpo LNK16, otro anticuerpo monoclonal anti-Fc γ R1IIIA (Advanced Immunological) (Tam et al., 1996, J. Immunol., 157: 1576-1581) y no fue bloqueado por un control de isotipo irrelevante. Por lo tanto, la unión del complejo tetramérico Fc γ R1IIIA soluble a las proteínas Fc mostradas en la superficie de la célula de levadura ocurre a través del sitio de unión del ligando normal. La unión limitada del complejo tetramérico Fc γ R1IIIA indica que una subpoblación de células tiene un Fc correctamente plegado que es accesible a Fc γ R. Hay numerosas razones por las que sólo 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 pueden no haber sido exportadas.

Con el fin de determinar la constante de disociación de la unión Fc γ R1IIIA tetramérico a las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura, se analizó la unión de un intervalo del complejo tetramérico Fc γ R1IIIA usando FACS. Se tituló el complejo tetramérico Fc γ R1IIIA a concentraciones de 1.4 μ M a 0.0006 μ M. Utilizando la intensidad media de fluorescencia como medida de afinidad de unión y análisis de regresión no lineal, se determinó que el K_D era 0.006 μ M (+/- 0.001) (datos no mostrados).

6.5 Construcción de la biblioteca mutante Fc

Se construyó una biblioteca de Fc mutante utilizando cebadores que flanqueaban el fragmento Fc en la construcción Fc-CH1 y PCR propensa a error (Genemorph, Stratagene). El inserto CH1-CH3 en el vector pYD-CHI se amplificó usando una PCR mutagénica (Genemorph, Stratagene). Se llevaron a cabo cinco reacciones utilizando los cebadores 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 ligación se transformó a continuación en células ultracompetentes XL10 (Stratagene), que dieron como resultado $\sim 1 \times 10^6$ transformantes, con 80% de los transformantes que contenían insertos.

El análisis de secuencias de 28 plásmidos aleatorios de la biblioteca indicó una frecuencia de mutación de $\sim 2-3$ mutaciones/kb con un desglose de cambios de nucleótidos conservados al 40% y el 60% de las mutaciones dando como resultado cambios de aminoácidos.

La biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100, MAT α ura3-52 trp I leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4::HIS3 prb1 Δ 1.6R puede I GAL GAL-AGA1::URA3 a una alta eficiencia, $\sim 3,3 \times 10^5$ transformantes/ μ g, en 30 reacciones de transformación independientes para crear un total de $\sim 10^7$ transformantes de levadura (Gietz et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 1425). La biblioteca se reunió y se amplificó por crecimiento en glucosa.

6.6 Selección y análisis de mutantes Fc

Materiales y métodos

Ensayo ELISA para el cribado de mutantes Fc

Se recubrieron placas ELISA (Nunc F96 MaxiSorp Immunoplate) con 50 ml/pozo de BSA-FITC 0.5 mg/ml en regulador carbonato a 4°C, y se dejó incubar durante la noche. Las placas se lavaron con 1X PBS/0.1% Tween 20 (PBST) 3 veces. Se añadieron 200 ml/pozo de PBST/BSA al 0.5% y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces más con PBST. Se añadieron 50 ml/pozo de anticuerpo 4-4-20 diluido al 1:4 (aproximadamente 3 mg/mL que conduciría a una concentración final de 0.7-0.8 mg/pozo) de tipo salvaje o que contenía un mutante Fc, a partir de medio condicional en PBST/BSA al 0.5% y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. Se añadió Fc γ R1IIIA monomérico biotinilado purificado a 3 mg/ml (en PBST/BSA al 0.5%) (50 μ l/pozo) a las placas y se dejó incubar durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. Se añadieron 50 ml/pozo de una dilución 1:5000 de estreptavidina-HRP (Pharmacia, RPN 123v) en PBST/BSA al 0.5% y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. Después se añadieron a las placas 80 ml/pozo de reactivo TMB (BioFX) y se dejó incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Las reacciones se detuvieron finalmente añadiendo 40 ml/pozo de solución de parada (ácido sulfúrico 0.18 M). Las placas se controlaron a continuación para determinar la absorbancia a 450 nm. Después de la primera criba, los candidatos interesantes se confirmaron además mediante titulación en serie de mutantes 4-4-20-Fc en el ELISA de unión basada en inmunocomplejo. Se realizaron algunas modificaciones en este ELISA. Para el recubrimiento de las placas, se utilizaron 2 mg/ml de BSA-FITC. Basándose en los resultados de la cuantificación de IgG, se añadieron 4-4-20Fc diluido (tipo salvaje o mutantes) a partir de medio condicional a una concentración final de 1,

0.5, 0.25, 0.125, 0.063 y 0 mg/ml en PBST/BSA al 0.5%.

Criba FACS para proteínas Fc desplegadas en la superficie celular

5 Las células se cultivaron en al menos 10 ml de HSM-Trp-Ura pH 5.5 con glucosa durante 16-24 horas o hasta que OD₆₀₀ fuera 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 matraz de 125 ml, se añadieron 36 ml de medio de galactosa, y se inocularon con 9 ml de cultivo, que se incubó a 20°C con agitación durante 24-48 horas. El crecimiento se controló midiendo OD₆₀₀ a intervalos de 8-16 h. Las células se cosecharon a 2K rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en un volumen igual de 1XPBS, pH 7.4.

10 Criba de equilibrio: Se incubó una cantidad apropiada de células manteniendo un exceso de ligando. Por ejemplo, se prefiere comenzar con un número de células necesarias para asegurar una cobertura de 10 veces de la biblioteca. Para el primer tipo con una biblioteca que contiene 10⁷ transformantes, se deben usar 10⁸ células. De hecho, es mejor comenzar con 10⁹ células para compensar la pérdida durante el protocolo de tinción.

15 La incubación se realizó típicamente en un tubo de 1.5 mL en volúmenes de 20-100 ml durante 1 hora a 4°C en la oscuridad sobre un rotador (regulador de incubación: 1XPBS pH 7.4 y 1 mg/ml de BSA). Las células se lavaron una vez en 500 ml de regulador de incubación y se centrifugaron a 4K rpm durante 2.5 minutos. Las células se resuspendieron en 100 ml de regulador de incubación y se incubaron con el segundo reactivo de tinción. Para Fc-CH1, se puede usar un anticuerpo F(ab)₂ de cabra anti-hFc F(ab)₂-FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) para teñir la expresión CH1. La tinción se realizó con 1 mL durante 30 minutos. Las células se lavaron adicionalmente en 500 mL de regulador de incubación y se centrifugaron a 4K rpm durante 2.5 minutos, se resuspendieron en 1 mL de 1X PBS 1 mg/mL de BSA y se analizaron mediante FACS.

20 Los portales de clasificación de criba de equilibrio típicos y el número de células recolectadas se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13. Portales de clasificación y número de células clasificadas

Ordenar	Portal	Total de células examinadas	Células recogidas
1°	5%	10 ⁸	5x10 ⁶
2°	1%	10 ⁷	1x10 ⁵
3°	0.2%	10 ⁷	2x10 ⁴
4°	0.2%	10 ⁷	2x10 ⁴

25 Después de las clasificaciones 3^a y 4^a, las células se colocaron directamente sobre placas de -trp-ura para identificar mutantes individuales. Esto típicamente recuperó ~200-400 colonias por placa. Después de la recolección, las células se colocaron en 10 mL de medio de glucosa en un tubo cónico de 50 mL y se cultivaron a 30°C. Todo el procedimiento se repitió iterativamente.

Resultados

30 Análisis FACS de Mutantes Fc

35 Después de la inducción en medios de galactosa, se cosecharon las células y se cotiñeron con el complejo tetramérico Fc_γR1IIIA soluble marcado con PE y F(ab)₂ de Fc-FITC antihumano de ratón marcado (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Las células se analizaron mediante FACS y se usaron portales de clasificación para seleccionar las células que mostraron la afinidad más alta por el complejo tetramérico Fc_γR1IIIA soluble en relación con la cantidad de expresión de Fc en la superficie celular (figura 9). Por ejemplo, una célula que contiene un Fc mutante que se une mejor al complejo tetramérico Fc_γR1IIIA soluble puede expresar menos proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura, y esta célula estará en la esquina inferior izquierda del portal de clasificación.

40 Se hicieron cuatro clasificaciones consecutivas para enriquecer aquellos mutantes que mostraban la afinidad más alta para el complejo tetramérico soluble en Fc_γR1IIIA. Los portales para cada tipo sucesivo fueron 5.5%, 1%, 0.2% y 0.1%. Después del último tipo, las células se sembraron en placas sobre medios selectivos y se aislaron colonias individuales. Cada colonia individual representó una población clonal de células que albergan un único mutante Fc dentro de la proteína de fusión Aga2-Fc. Inicialmente se recogieron 32 colonias independientes y se ensayaron mediante FACS para la unión al complejo tetramérico soluble Fc_γR1IIIA (figura 10). Dieciocho mutantes mostraron un aumento en la intensidad de unión, medido por el porcentaje de células unidas por complejo Fc_γR1IIIA tetramérico soluble y la intensidad de fluorescencia media de las células unidas.

También se ensayaron mutaciones que mostraban un aumento en la unión a Fc γ RIIIA para la unión al complejo tetramérico Fc γ RIIB soluble (figura 10). La mayoría de las mutaciones que conducen a un aumento de la unión al complejo tetramérico Fc γ RIIIA soluble también resultaron en la detección de la tinción del complejo tetramérico Fc γ RIIB (figura 10). Basándose en datos físicos y genéticos previos, se espera que algunas mutaciones que aumenten la unión a Fc γ RIIIA, también aumenten la unión a Fc γ RIIB (Shields et al., 2001, J Biol. Chem. 276: 6591-6604, Sondermann et al., 2000, Nature 406: 267-273).

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

El aislamiento y el análisis de mutaciones en el sistema de levadura permiten una rápida identificación de nuevos alelos mutantes. El uso de un sistema heterólogo para aislar mutaciones podría dar lugar a la identificación de mutaciones que potencian la unión a través de una alteración que da como resultado la síntesis o alteración de la glicosilación que es específica para la levadura. Analizar las mutaciones Fc en una molécula de inmunoglobulina que se produce en células humanas. Los mutantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, que contenía la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 J.Biol.Chem, 257(12): 6987-6995). Las cadenas pesadas 4-4-20 mutantes se coexpresaron transitoriamente con los clones de la cadena ligera en la línea de células de riñón humano (293H). Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA (figura 11).

De acuerdo con el ensayo ELISA, la mayoría de los mutantes que se identificaron como que tenían una afinidad mejorada para el complejo Fc γ RIIA monomérico soluble, en el análisis FACS secundario, también mostraron un aumento en la unión a la tetramérica soluble Fc γ RIIIA cuando está presente en la región Fc del anticuerpo monoclonal 4-4-20 producido en la línea celular humana (figura 11A). Sin embargo, dos mutantes, número 16 y número 19, mostraron una disminución en la unión al complejo monomérico Fc γ RIIIA soluble.

La Tabla 14 resume las mutaciones que se han identificado y sus características de unión correspondientes a Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB, según se determinó por los ensayos basados en criba de levadura y por ELISA. En la Tabla 14, los símbolos representan lo siguiente: corresponde a un aumento de la afinidad de 1 vez; + corresponde a un aumento del 50% en la afinidad; - corresponde a una disminución de 1 en la afinidad; → corresponde a ningún cambio en la afinidad en comparación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje.

Tabla 14: Mutaciones identificadas y características de unión

Clon #	Sitios de mutación	Dominio	IIIA enlazante	IIB enlazante
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
7	Aga2p-T43I	Nota: Esta es una mutación en Aga2P que mejora la visualización.		Aga2p-T43I
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1,bisagra,CH2, CH3	Sin 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	Sin cambio	Sin cambio
15	R301C, M252L, S192T	CH1,CH2	-	no probado
17	N315I	CH2	Sin cambio	no probado
18	S132I	CH1	Sin cambio	no probado
26	A162V	CH1	Sin cambio	no probado
27	V348M, K334N, F275I, Y202M,	CH1,CH2	+	+

ES 2 637 491 T3

	K147T			
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	no probado
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1,CH2,CH3	+	Sin cambio
31	K409R, S166N	CH1,CH3	Sin cambio	no probado
20	S408I, V215I, V125I	CH1,bisagra,CH3	+	Sin cambio
24	G385E, P247H	CH2, CH3	•••	+
16	V379M	CH3	••	Sin cambio
17	S219Y	bisagra	•	-
18	V282M	CH2	•	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	Sin cambio
35	D401V	CH3	+	Sin cambio
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	bisagra	•	Sin cambio
41	K246T, Y319F	CH2	•	Sin 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	•	Sin cambio
54	I377F	CH3	•+	+
57	K334I	CH2	•	Sin cambio
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2,CH3	•+	•+
59	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2,CH3	•+	Sin 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	•+	Sin cambio
70	K326E	CH2	•+	••+

71	F372Y	CH3	+	+++++
72	K326E (aislado independiente)	CH2	+	**
74	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2,CH3	**	Sin cambio
75	K334E (aislado independiente)	CH2	**+	Sin cambio
76	P396L (aislado independiente)	CH3	**	Sin cambio
78	K326E (aislado independiente)	CH2	**	+++
79	K246I, K334N	CH2	•	****
80	K334E (aislado independiente)	CH2	•	Sin cambio
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L	CH2,CH3	•	Sin cambio
82	K320E, K326E	CH2	•	•
84	H224L	Bisagra	•	*****
87	S375C, P396L	CH3	**	+++++
89	E233D, K334E	CH2	**	Sin cambio
91	K334E (aislado independiente)	CH2	•	Sin cambio
92	K334E (aislado independiente)	CH2	•	Sin cambio
94	K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	•	Sin cambio

El análisis de la unión del complejo tetramérico Fc γ RIIB soluble muestra que 7 de los 8 mutantes que mostraron un aumento en la unión al complejo tetramérico Fc γ RIIA soluble también tuvieron una unión aumentada al complejo tetramérico soluble en Fc γ RIIB (figura 11B). Un mutante, el número 8, mostró una disminución en la unión al complejo tetramérico Fc γ RIIB soluble. Tres de los mutantes no muestran diferencias en la unión al complejo tetramérico Fc γ RIIA soluble o al complejo tetramérico soluble Fc γ RIIB, posiblemente debido a mutaciones que dan lugar a alteraciones específicas de la levadura.

6.7 Ensayo ADCC de mutantes de Fc

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

Preparación de células diana: Las células diana utilizadas en el ensayo fueron SK-BR-3 (número de acceso de ATCC HTB-30: Trempe et al., 1976, Cancer Res. 33-41), Raji (número de acceso ATCC CCL-86, Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-40), o células Daudi (número de acceso ATCC CCL-213, Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10) se resuspendieron en 0.5 mL de medio IMDM) y se marcaron con quelato de europio bis(acetoximetil) 2,2":6',2" terpiridina 6,6' dicarboxilato (reactivo BATDA, reactivo Perkin Elmer DELFIA; C136-100). Se usaron células K562 (número de acceso ATCC CCL-243) como células de control para la actividad NK. Las

células Daudi y Raji fueron centrifugadas; las células SK-BR-3 se tripsinizaron durante 2-5 minutos a 37°C, CO₂ al 5% y el medio se neutralizó antes de centrifugar a 200-350 G. El número de células diana usadas en los ensayos fue de aproximadamente 4 -5x10⁶ células y no superó 5x10⁶ ya que la eficacia de marcado era mejor con tan sólo 2x10⁶ células. Una vez que las células se centrifugaron, el medio se aspiró a 0.5 ml en tubos Falcon de 15 mL. Se añadieron 2.5 µl de reactivo BATDA 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 de sulfipirazol). Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de ensayo, se contaron y se diluyeron.

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

Opsonización de anticuerpos: Una vez que las células diana se prepararon como se describe anteriormente, se opsonizaron con los anticuerpos apropiados. En el caso de variantes Fc, se añadieron 50 µL de 1x10⁵ células/mL a la concentración 2x del anticuerpo que alberga la variante Fc. Las concentraciones finales fueron las siguientes: Concentración final de Ch-4-4-20 fue 0.5-1 µg/mL; y la concentración final de Ch4D5 fue de 30 ng/mL-1 ng/mL.

Se añadieron células diana opsonizadas a células efectoras para producir una relación efector:objetivo de 75:1 en el caso de los anticuerpos 4-4-20 con variantes de Fc. En el caso de los anticuerpos Ch4D5 con variantes Fc, se logró una relación efector:objetivo de 50:1 o 75:1. El gradiente efectivo de PBMC para el ensayo oscila entre 100:1 y 1:1. La liberación espontánea (SR) se midió añadiendo 100 µL de medio de ensayo a las células; Se midió la liberación máxima (MR) añadiendo 4% de TX-100. Las células se centrifugaron a 200 rpm en una centrífuga Beckman durante 1 minuto a temperatura ambiente a 57°C. Las células se incubaron durante 3-3.5 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 1000 rpm en una centrífuga Beckman (aproximadamente 220xg) durante cinco minutos a 10°C. Se recogieron 20 µl de sobrenadante; se añadieron 200 µl de solución de 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 resuelto en el tiempo (Victor 1420, Perkin Elmer).

Resultados

Como se describió anteriormente, las regiones Fc variantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, que contenía la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antilfluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem, 257(12): 6987-6995). Las cadenas pesadas variantes 4-4-20 fueron coexpresadas transitoriamente con los clones de la cadena ligera en la línea celular de riñón humano (293H). Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron usando el ensayo ADCC. La figura 12 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 tenían una actividad de ADCC mejorada con respecto al tipo salvaje ch 4-4-20. Los cinco mutantes eran 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).

Se ensayaron inmunoglobulinas adicionales 4-4-20 con regiones Fc variantes para su actividad ADCC relativa a una inmunoglobulina 4-4-20 con una región Fc de tipo salvaje. Estos resultados se resumen en la Tabla 15.

Los ensayos ADCC también se llevaron a cabo utilizando el mismo protocolo que el 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 diana que fueron opsonizadas con un anticuerpo HER2/neu que portaba una región Fc variante. HER2/neu se expresa endógenamente por las células SK-BR-3 y, por lo tanto, presentes en la superficie de estas células. La figura 13 muestra la actividad de ADCC de anticuerpos HER2/neu que llevan 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 comparando la concentración del mutante con el anticuerpo de tipo salvaje requerido para un valor específico de porcentaje de lisis celular.

Como se muestra en la figura 13A, 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 fueron clonados en el anticuerpo anti-HER2/neu humanizado exhibieron una mayor lisis específica en porcentaje de células SK-BR-3 en relación con el anticuerpo salvaje.

Tabla 15. Resumen de la actividad ADCC de mutantes

	Variante Fc		ADCC	
Etiqueta	Ref	Variación de Aminoácidos	1ug/ml	0.5ug/ml

ES 2 637 491 T3

			% de lisis específica	Normalizado	% 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	N3151, V379M, T394M	20%	1.37	10%	1.69
MGFc-29	3D11	F2431, 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, L4411	9%	0.62	4%	0.75
MGFc-33	3C9	K317N, F423 suprimido	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: Resumen de mutantes

Variante Fc	Cambios de aminoácidos	FcR3A, K _D /K _{inactivo}	FcR2B, K _D /K _{inactivo}	Unión ELISA IIIA	Unión ELISA IIB	Fagocitosis (mutante/WT)	4-4-20 ADCC (mutante/wt)	Anti-HER2 ADCC (mutante/wt)
Wt	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	Reducida	?	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	Reducida	0.8	2.38	1.00
MGFc3	K334E, T359N, T366S	55.2/0.128	72/0.11	1.5X	N/C	1	1.57	3.67
MGFc 14	K288M, K334E	75.4/0.1	95.6/0.089	3X	Reducida	1	1.74	
MGFc 23	K334E, R292L	70.2/0.105	108/0.107			1	2.09	1.06
MGFc 27	G316D, 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	135	2.90	1.00

Variante Fc	Cambios de aminoácidos	FcR3A, K _o /K _{inactivo}	FcR2B, K _o /K _{inactivo}	Unión ELISA IIIA	Unión ELISA IIB	Fagocitosis (mutante/WT)	4-4-20 ADCC (mutante/wt)	Anti-HER2 ADCC (mutante/wt)
MGFc 37	K248M	154/0.175	100/0.091	1.4X	Reducida	0.98	3.83	0.67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0.104	50/0.041	4.5X	2.5	1.4	3.07	2.50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0.198	86/0.074	1.4X	Reducida	1.5	4.29	0.50
PAGFc 40	K248M	180/0.186	110/0.09	1.4X	Reducida	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	55.7/0.04.1	3.5X	2X	1.58	1.09	

6.8 Análisis de los parámetros cinéticos de los mutantes de Fc

Los parámetros cinéticos de la unión de anticuerpos ch4-4-20 que albergan mutantes Fc a Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IIB se analizaron usando un ensayo BIAcore (instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.). El Fc γ R1IIIA utilizado en este ensayo era una proteína monomérica soluble, la región extracelular de Fc γ R1IIIA unida a la secuencia de enlazador-AVITAG como se describe en la Sección 6.2 supra. El Fc γ R1IIB utilizado en este ensayo fue una proteína dimerica soluble preparada de acuerdo con la metodología descrita en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/439,709 presentada el 13 de enero de 2003, la cual se incorpora aquí como referencia. En resumen, el Fc γ R1IIB utilizado fue el dominio extracelular de Fc γ R1IIB fusionado con la bisagra-CH2-CH3 dominio de la IgG2 humana.

Se inmovilizó BSA-FITC (36 μ g/mL en regulador de acetato 10 mM a pH 5.0) en una de las cuatro células de flujo (célula de flujo 2) de una superficie de chip sensor a través de la 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 inmovilizaron en la superficie. Después de esto, los ésteres activos sin reaccionar fueron "tapados" con una inyección de Et-NH₂ 1 M. Una vez que se preparó una superficie adecuada, los anticuerpos ch 4-4-20 que portaban las mutaciones Fc se pasaron sobre la superficie mediante inyecciones de un minuto de una 20 μ g/mL a un caudal de 5 μ l/Min. El nivel de anticuerpos ch-4-4-20 unidos a la superficie oscilaba entre 400 y 700 RU. A continuación, las series de dilución del receptor (Fc γ R1IIIA y la proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc) en regulador HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, 0.005% de tensioactivo P20, 3 mM EDTA, pH 7.4) sobre la superficie a 100 μ l/min se llevó a cabo la regeneración del anticuerpo entre diferentes diluciones del receptor por inyecciones únicas de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM pH 9.4, NaCl 3M.

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

Una vez que se recogió un conjunto de datos completo, las curvas de unión resultantes se ajustaron globalmente utilizando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto el K_{activo} como el K_{apagado} , a partir de los cuales se deduce la constante de unión de equilibrio aparente, K_D como la relación de las dos constantes de velocidad (es decir, $K_{\text{apagado}}/K_{\text{activo}}$). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Se alinearon curvas de unión para dos concentraciones diferentes (200 nM y 800 nM para Fc γ R1IIIA y 200 nM y 400 nM para la proteína de fusión Fc γ R1IIB) y se ajustaron las respuestas al mismo nivel de anticuerpos capturados, y se restaron las curvas de referencia a partir de las curvas experimentales. Las fases de asociación y disociación se ajustaron por separado. La constante de velocidad de disociación se obtuvo para el intervalo 32-34 seg de la fase de disociación; asociación fase ajuste se obtuvo por un modelo Langmuir 1:1 y ajuste de la base se seleccionó sobre la base R_{max} y χ^2 criterios.

35 Resultados

La figura 14 muestra la captura de anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes en el chip de sensor inmovilizado BSA-FITC. Se inyectaron 6 μ l de anticuerpos a una concentración de aproximadamente 20 μ g/mL a 5 μ l/min sobre la superficie BSA-FITC. La figura 15 es un sensograma de unión en tiempo real de Fc γ R1IIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que llevan regiones Fc variantes. La unión de Fc γ R1IIIA se analizó a 200 nM de concentración y se normalizaron las respuestas de la señal de resonancia al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo salvaje. Se obtuvieron parámetros cinéticos para la unión de Fc γ R1IIIA a anticuerpos ch-4-4-20 ajustando los datos obtenidos en dos concentraciones de Fc γ R1IIIA diferentes, 200 y 800 nM. (Figura 16). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo basado en los valores de K_{apagado} calculados para las curvas de disociación en el intervalo 32-34 segundos. K_D y K_{apagado} representan el promedio calculado a partir de las dos concentraciones de Fc γ R1IIIA diferentes utilizadas. La figura 17 es un sensograma de unión en tiempo real de la proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que llevan regiones Fc variantes. La unión de la proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc se analizó a una concentración de 200 nM y las respuestas de la señal de resonancia se normalizaron al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo salvaje. Los parámetros cinéticos para la unión de la proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc a los anticuerpos ch-4-4-20 se obtuvieron ajustando los datos obtenidos en dos concentraciones de proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc diferentes, 200 y 800 nM (figura 18). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo basado en el K_{apagado} calculado para las curvas de disociación en el intervalo 32-34 segundos. K_D y K_{apagado} representan el promedio de las dos concentraciones diferentes de proteína de fusión Fc γ R1IIB-Fc utilizadas.

Los parámetros cinéticos (K_{activo} y K_{apagado}) que se determinaron a partir del análisis BIAcore se correlacionaron con la característica de unión de los mutantes como se determinó mediante un ensayo ELISA y la actividad funcional de los mutantes como se determinó en un ensayo ADCC. Específicamente, como se observa en la Tabla 17, los mutantes que tenían una actividad de ADCC mejorada con relación a la proteína de tipo salvaje y tenían una unión mejorada a Fc γ R1IIIA determinada por un ensayo de ELISA, tenían un K_{apagado} mejorado para Fc γ R1IIIA (es decir, un

menor $K_{apagado}$). Por lo tanto, un menor valor de $K_{apagado}$ para $Fc\gamma RIII A$ de una proteína Fc mutante con respecto a una proteína de tipo salvaje puede ser probable que tenga una función ADCC mejorada. Por otra parte, como se observa en la Tabla 18, los mutantes que tenían una actividad de ADCC mejorada con relación a la proteína de tipo salvaje y tenían una unión reducida para la proteína de fusión $Fc\gamma RIIB-Fc$ según se determinó mediante un ensayo ELISA tuvieron un $K_{apagado}$ mayor para $Fc\gamma RIIB-Fc$ proteína de fusión.

De este modo, los valores de $K_{apagado}$ para $Fc\gamma RIII A$ y $Fc\gamma RIIB$ se pueden usar como medidas predictivas de cómo un mutante se comportará en un ensayo funcional tal como un ensayo de ADCC. De hecho, las relaciones de los valores de $K_{apagado}$ para $Fc\gamma RIII A$ y la proteína de fusión $Fc\gamma RIIB-Fc$ de los mutantes a la proteína de tipo salvaje se trazaron contra los datos de ADCC (figura 19). Específicamente, en el caso de los valores de $K_{apagado}$ para $Fc\gamma RIII A$, se trazó la relación de $K_{apagado} (wt)/K_{apagado} (mutante)$ contra los datos de ADCC; y en el caso de los valores de $K_{apagado}$ para $Fc\gamma RIIB$, se trazó la relación de $K_{apagado} (mut)/K_{apagado} (wt)$ contra los datos de ADCC. Los números superiores a uno (1) muestran una tasa de disociación disminuida para $Fc\gamma RIII A$ y una tasa de disociación incrementada para $Fc\gamma RIIB-Fc$ con respecto al tipo salvaje. Los mutantes que se encuentran dentro de la caja indicada tienen una tasa de desconexión más baja para la unión a $Fc\gamma RIII A$ y una tasa de descuento mayor para la unión $Fc\gamma RIIB-Fc$, y poseen una función ADCC mejorada.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la unión de $FcRIII A$ a $ch4-4-20Ab$ obtenidos por "ajuste separado" de curvas de unión de 200 nM y 800 nM

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K_{on} 1/Ms	$K_{apagado}$, 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	26
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 destacados no encajan en el grupo mediante datos ELISA o ADCC.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de la unión de $FcRIIB-Fc$ al $ch4-4-20Ab$ de tipo salvaje y mutante obtenidos por "ajuste separado" de curvas de unión de 200 nM y 800 nM.

ES 2 637 491 T3

Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd,nM	K _{on} 1/Ms	K _{apagado} , 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	0.6	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	1.38	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 Criba para mutantes Fc usando múltiples rondas de enriquecimiento usando un ensayo en fase sólida

5 Las siguientes cribas de mutantes estaban dirigidas a identificar conjuntos adicionales de mutantes que mostraran una unión mejorada a FcγRIIIA y una unión reducida a FcγRIIB. La selección secundaria de las variantes de Fc seleccionadas se realizó por ELISA, seguido de pruebas para ADCC en el sistema 4-4-20. Los mutantes se seleccionaron principalmente sobre la base de su capacidad para mediar ADCC vía 4-4-20 usando células SK-BR3 recubiertas con fluoresceína como dianas y PBMC aisladas de donantes humanos como la población de células efectoras. Los mutantes Fc que mostraron un aumento relativo en ADCC, por ejemplo, un aumento en un factor 2, fueron clonados en anticuerpos anti-HER2/neu o anti-CD20 chAbs y probados en un ensayo ADCC usando las
10 células tumorales apropiadas como dianas. Los mutantes también se analizaron mediante BIAcore y se determinó su K_{apagado} relativo.

15 Criba 1: Disminución en fase sólida secuencial y selección usando perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB seguido por selección con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIIA. El objetivo de esta criba fue la identificación de Fc mutantes que ya no se unan a FcγRIIB o mostrar la reducción de la unión a FcγRIIB. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca ingenua (~10⁷ células) con perlas magnéticas ("My One", Dynal) recubiertas con FcγRIIB. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida mediante la colocación del tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Las células de levadura que no estaban unidas a las perlas se retiraron y se colocaron en medio fresco. A continuación se unieron a perlas que se recubrieron con FcγRIIIA. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida colocando el tubo que contenía la mezcla en un campo magnético. La levadura no unida se eliminó y las células unidas se eliminaron por agitación vigorosa. Las células recuperadas se regeneraron en medio que contenía glucosa y se reindujeron en medios selectivos que contenían galactosa. Se repitió el proceso de selección. El cultivo final se usó para recolectar ADN. Los insertos que contenían el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en 4-4-20. Aproximadamente 90 mutantes Fc fueron seleccionados por 4-4-20 ELISA y ADCC ensayos y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 19.
20

Tabla 19: Mutantes seleccionados por disminución en fase sólida secuencial y selección usando perlas magnéticas recubiertas con Fc γ R1IB seguida por selección con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ R1IIIA.

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

- 5 Cribas 2 y 3: Mutantes seleccionados por FACS, Equilibrium y Kinetic Screening: La primera criba de biblioteca identificó una mutación en la posición 396, cambiando el aminoácido de prolina a leucina (P396L). Esta variante de Fc mostró una unión aumentada tanto a Fc γ R1IIIA como a Fc γ R1IB. Se construyó una segunda biblioteca utilizando P396L como una línea base. La mutagénesis por PCR se usó para generar $\sim 10^7$ mutantes, cada uno de los cuales contenía la mutación P396L y contenía cambios de nucleótidos adicionales. La biblioteca P396L se seleccionó utilizando dos conjuntos de condiciones.
- 10 Se llevó a cabo un escrutinio de equilibrio utilizando un Fc γ R1IIIA-Linker-Avitag biotinilado como monómero, utilizando métodos ya descritos. Se incubaron aproximadamente 10 veces el exceso de biblioteca (10^8 células) en un 0.5 mL de aproximadamente 7 nM de Fc γ R1IIIA durante 1 hora. La mezcla se clasificó mediante FACS, seleccionando el 1.2% superior de aglutinantes. Se cultivaron células de levadura seleccionadas en medios selectivos que contenían glucosa y se reindujeron en medios selectivos que contenían galactosa. La criba de equilibrio se repitió una segunda
- 15 vez y el portal de clasificación se ajustó para recoger el 0.2% superior de ligantes. Las células de levadura seleccionadas se cultivaron entonces en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo fue utilizado para recolectar ADN. Los insertos que contenían el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable 4-4-20 usando métodos ya descritos. Aproximadamente 90 mutantes Fc fueron seleccionados por 4-4-20 ELISA y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 20
- 20 Tabla 20: Mutantes seleccionados por FACS usando una criba de equilibrio con concentraciones de FcR1IIIA 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

- 25 También se implementó una criba cinética para identificar mutantes con $K_{apagado}$ mejorado en la unión Fc γ R1IIIA. Se establecieron condiciones para cribar la biblioteca P396L usando una cepa con la variante Fc P396L deldelegada en la superficie de la levadura. En resumen, las células cultivadas bajo condiciones de inducción se incubaron con 0.1 μ M de monómero biotinilado Fc γ R1IIIA-Linker-Avitag durante 1 hora. Las células se lavaron para eliminar el ligando marcado. Las células marcadas se incubaron entonces durante diferentes tiempos con 0.1 μ M de monómero Fc γ R1IIIA-Linker-Avitag no marcado, se lavaron y luego se tiñeron con SA:PE para análisis FACS (figura 20). Las
- 30 células también se tiñeron con Fc antihumano de cabra para mostrar que la presentación Fc se mantuvo durante el experimento.

Basándose en el estudio de competición, se determinó que una incubación de 1 minuto dio como resultado una pérdida de aproximadamente 50% de la tinción celular. Este punto de tiempo se eligió para la criba cinética usando

- la biblioteca P396L. Se incubó un exceso de aproximadamente 10 veces de la biblioteca (10^8 células) con monómero $Fc\gamma RIII A$ -Avitag biotinilado $0.1 \mu M$ en un volumen de 0.5 mL. Las células se lavaron y luego se incubaron durante 1 minuto con un ligando no marcado. Posteriormente, las células se lavaron y marcaron con SA:PE. La mezcla se clasificó mediante FACS, seleccionando el 0.3% superior de aglutinantes. Se cultivaron células de levadura seleccionadas en medios selectivos que contenían glucosa y se reindujeron en medios selectivos que contenían galactosa. La criba cinética se repitió una segunda vez y el portal de clasificación se ajustó para recoger el 0.2% superior de aglutinantes. La biblioteca de P396L no sintetizada se comparó con las células de levadura seleccionadas para una unión mejorada por FACS (figura 21). Los histogramas muestran el porcentaje de células que se cubren tanto con $Fc\gamma RIII A/PE$ como con $Fc/FITC$ antihumano de cabra (superior derecha).
- 10 Las células de levadura seleccionadas de la segunda clase se hicieron crecer entonces en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo fue utilizado para recolectar ADN. Los insertos que contenían el dominio Fc se amplificaron por PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable 4-4-20 usando métodos descritos anteriormente. Aproximadamente 90 mutantes Fc fueron seleccionados por 4-4-20 ELISA y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 21.
- 15 Tabla 21: Mutantes seleccionados mediante FACS usando una criba cinética usando cantidades equimolares de CD16A no marcado durante 1 minuto.

Mutante	Cambios de aminoácidos
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

- Cribas 4 y 5: Combinación del paso de disminución $Fc\gamma RIIB$ en fase sólida con $Fc\gamma RIII A$ selección por clasificación FACs, utilizando el alelo $Fc\gamma RIII A$ 158V
- 20 El análisis de las variantes Fc de la criba 1 mostró que las mutaciones que se seleccionaron de la criba secundaria habían mejorado la unión tanto a $Fc\gamma RIII A$ como a $Fc\gamma RIIB$. Por lo tanto, los datos sugirieron que la disminución secuencial y la selección utilizando perlas magnéticas (fase sólida) en las condiciones establecidas no seleccionó eficientemente la unión diferencial de $Fc\gamma RIII A$ y $Fc\gamma RIIB$. Por lo tanto, con el fin de cribar más eficazmente los mutantes que se unen a $Fc\gamma RIII A$, a la vez que se ha reducido o no hay ninguna unión a $Fc\gamma RIIB$, la etapa de
- 25 disminución de $Fc\gamma RIIB$ en fase sólida se combinó con selección de $Fc\gamma RIII A$ por clasificación FACs. Esta combinación identificó variantes de Fc que se unen a $Fc\gamma RIII A$ con mayor o igual afinidad que Fc de tipo salvaje.
- Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca ingenua ($\sim 10^7$) con perlas magnéticas recubiertas con $Fc\gamma RIIB$. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida mediante la colocación del tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Aquellas células de levadura que no estaban unidas a las perlas se retiraron y se colocaron en medio fresco y posteriormente se reindujeron en medios que contenían galactosa. La disminución de $Fc\gamma RIIB$ por perlas magnéticas se repitió 5 veces. Se analizó la población de levadura resultante y se encontró que mostraba una tinción celular mayor que el 50% con Fc antihumano de cabra y un porcentaje muy pequeño de células se tiñeron con $Fc\gamma RIII A$. Estas células se seleccionaron entonces dos veces por una clasificación FACS utilizando $0.1 \mu M$ biotinilado $Fc\gamma RIII A$ -Linker-Avitag (datos no mostrados). El $Fc\gamma RIII A$ fue el alotipo 158V. Las células de levadura se
- 30 analizaron tanto para enlazante $Fc\gamma RIII A$ y $Fc\gamma RIIB$ después de cada tipo y en comparación con la unión por el dominio de Fc de tipo salvaje (figuras 22A-B).
- 35 Las células de levadura seleccionadas del segundo tipo se cultivaron a continuación en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se utilizó entonces para recolectar ADN. Los insertos que contenían el dominio Fc se amplificaron mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable 4-4-20. Aproximadamente 90 mutantes Fc fueron seleccionados por 4-4-20 ELISA y ADCC y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 22 (mutantes 61-66).
- 40

Tabla 22: Mutantes seleccionados por disminución en perlas magnéticas usando perlas recubiertas con CD32B y selección final por FACS usando Fc γ R11IA 158 valina o 158 fenilalanina

Mutante	Cambios de aminoácidos
MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N361D
MgFc64	E233G
MgFc65	N276Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T

5 Cribado de mutantes Fc usando el alelo 158F de Fc γ R11IA: Existen dos alelos diferentes del receptor Fc γ R11IA que tienen diferentes afinidades de unión para el dominio Fc de IgG1 (Koene et al., 1997, Blood 90: 1109-1114; Wu et al., 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70). El alelo 158F se une al dominio Fc con una constante de unión 5-10 veces menor que el alelo 158V. Anteriormente, todas las cribas de Fc utilizando levadura de visualización se realizaron utilizando el ligando de alto enlace 158V como un ligando. En este experimento, los mutantes Fc se seleccionaron de la población de levadura empobrecida Fc γ R11B usando monómero Avitag Fc γ R11IA158F biotinilado como un
10 ligando. El portal de clasificación se ajustó para seleccionar los aglutinantes de 0.25 por ciento de Fc γ R11IA 158F. La población enriquecida resultante se analizó mediante FACS (figura 22B). A continuación se aislaron los clones individuales y se analizó su unión a diferentes Fc γ R mediante FACS (figura 22B). El análisis de clones individuales de la población dio como resultado la identificación de un único mutante que alberga 5 mutaciones MgFc67 (V284M, S298N, K334E, R355W, R416S), que tenía una unión mejorada a Fc γ R11IA y una unión reducida a Fc γ R11B.

15 Criba Secundaria de mutantes mediante un ensayo de ADCC para las cribas 1, 2 y 3:

Los mutantes que se seleccionaron en las cribas anteriores se analizaron después usando un ensayo estándar de ADCC para determinar las velocidades relativas de lisis mediadas por ch4-4-20 que albergaban los mutantes Fc. Los anticuerpos ch4-4-20 que llevan las variantes Fc se construyeron usando métodos ya descritos anteriormente. Se usaron células SK-BR3 como dianas y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron a partir de donantes
20 usando un gradiente de Ficoll, como se describe supra (Sección 6.7). Los resultados de la actividad ADCC para los mutantes se resumen en la Tabla 23.

Como se observa en la Tabla 23, los mutantes aislados usando las cribas primarias y secundarias anteriores basadas en la disminución de Fc γ R11B y la selección de Fc γ R11IA mostraron actividad de ADCC mejorada en relación con el tipo salvaje.

25 Tabla 23: Análisis de ADCC mediado por anticuerpo antiluoresceína 4-4-20 sobre células SKBR3 revestidas con fluoresceína.

Mutante	Cambios de aminoácidos	Tasa relativa de lisis
MgFc37	K248M	3.83
MgFc38	K392T, P396L	3.07
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4.29
MgFc41	H268N, P396LN	2.24
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.09
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,	
MgFc42	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 demás anticuerpos se ensayaron a 1 µg/mL. Todas las tasas se normalizaron a tipo salvaje ch4-4-20 (IgG1).

5 Los mutantes se clonaron adicionalmente en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antitumoral 4D5 (anti-HER2/neu) y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 2H7 sustituyendo el dominio Fc de estos anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron y purificaron y ensayaron en un ensayo de ADCC usando métodos estándar mediante transfección transitoria en células 293H y purificación sobre la columna de proteína G. Los anticuerpos 4D5 quiméricos se ensayaron en un ensayo ADCC usando células SK-BR3 como dianas (figura 23), mientras que los anticuerpos 2H7 quiméricos se ensayaron en un ensayo ADCC usando células Daudi como dianas (figura 24).

10 Criba secundaria de mutantes a través de BIAcore: Los mutantes que se seleccionaron en las cribas anteriores se analizaron luego mediante BIAcore para determinar los parámetros cinéticos para la unión de Fc γ RIIIA (158V) y Fc γ RIIB. El método utilizado fue similar al descrito en la Sección 6.8, supra.

15 Los datos mostrados son valores de K_{apagado} relativos a las velocidades de desconexión del tipo salvaje según se determina a partir de experimentos usando los mutantes Fc en el anticuerpo monoclonal ch4-4-20. Los números relativos mayores que uno indican una disminución en la tasa de K_{apagado} . Los números inferiores a uno indican un aumento en la tasa de desconexión.

20 Los mutantes que mostraban una disminución en las tasas de inactivación para Fc γ RIIIA eran 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 mostraban una disminución de la velocidad de disociación para Fc γ RIIB eran 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.

Mutante Fc	Residuos AA	Fc γ RIIIA158V (K _{apagado} WT/Mut)	Fc γ RIIB (K _{apagado} 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	1.4
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1.23	2.29
	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L,		
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	K261N, 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, V427M	1	0.62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T		

6.10 Ensayos ADCC mediados por PBMC

Materiales y métodos

5 Las variantes de Fc que muestran una unión mejorada a Fc γ R1IIIA se ensayaron mediante ADCC basado en PBMC utilizando una relación efector:objetivo de 60:1. Se usaron dos sistemas de modelo de tumor diferentes como dianas SK-BR3 (anti-HER2/neu) y Daudi (anti-CD20). El porcentaje de lisis específico se cuantificó para cada mutante. Se usó un análisis de regresión lineal para trazar los datos fijando la lisis de porcentaje máximo al 100%.

10 El ADCC se activa en las células efectoras del sistema inmune a través de una vía de transducción de señales que se activa por una interacción entre Fc γ R de baja afinidad y un complejo inmune. Las poblaciones de células efectoras se obtuvieron a partir de sangre primaria o macrófagos derivados de monocitos activados (MDM). Las

células diana se cargaron con europio y se incubaron con MAb quimérico y posteriormente se incubaron con poblaciones de células efectoras. El europio funciona de la misma manera que ^{51}Cr . Pero no es radiactivo y el europio liberado se detecta en un lector de placas fluorescentes. Los linfocitos cosechados de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) contienen principalmente células asesinas naturales (NK). La mayoría de la actividad de ADCC se producirá a través de la NK que contiene $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ pero no $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ en su superficie.

Los experimentos se realizaron utilizando dos poblaciones de células diana diferentes, SK-BR-3 y Daudi, que expresan HER2/neu y CD20, respectivamente. Los ensayos ADCC se establecieron utilizando Ch4-4-20/FITC recubiertos SK-BR-3, Ch4D5/SKBR3, y Rituxan/Daudi (datos no presentados). 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 células SK BR3 (figura 27). La gráfica muestra un análisis de regresión lineal de un ensayo estándar de ADCC. El anticuerpo se tituló a lo largo de 3 registros utilizando una relación efector a objetivo de 75:1. % de lisis = (liberación experimental SR)/(MR-SR) * 100.

Los mutantes Fc mostraron una actividad ADCC mediada por PBMC mejorada en células Daudi (figura 28).

6.11 Ensayos ADCC basados en el macrófago derivado de monocito (MDM)

La muerte de células tumorales dependientes de $\text{Fc}\gamma\text{R}$ está mediada por células de macrófagos y NK en modelos de tumores de ratón (Clynes et al., 1998, PNAS USA, 95: 652-6). Los monocitos elutriados de donantes se utilizaron como células efectoras para analizar la eficacia de los mutantes Fc para activar la citotoxicidad celular de células diana en ensayos ADCC. Los patrones de expresión de $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{R3A}$ y $\text{Fc}\gamma\text{R2B}$ están afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de $\text{Fc}\gamma\text{R}$ a partir de monocitos congelados cultivados en medios que contenían diferentes combinaciones de citoquinas y suero humano se examinaron mediante FACS usando MAB específicos de FcR. (figura 29). Las células cultivadas se tiñeron con anticuerpos $\text{Fc}\gamma\text{R}$ específicos y se analizaron mediante FACS para determinar los perfiles MDM $\text{Fc}\gamma\text{R}$. Las condiciones que mejor imitan la expresión de $\text{Fc}\gamma\text{R}$ *in vivo* de macrófagos, es decir, que mostraron que la mayor fracción de células que expresan CD16 y CD32B se usaron en un ensayo de ADCC basado en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Para el experimento de la figura 29, se cultivaron monocitos elutriados congelados durante 8 días en DMEM y FBS al 20% que contenía M-CSF (condición 1) o GM-CSF (condición 2). Para el experimento de la figura 30, los monocitos elutriados congelados se cultivaron durante 2 días en DMEM y FBS al 20% que contenía GM-CSF, IL-2 e $\text{IFN}\gamma$ antes del ensayo ADCC. También se han desarrollado condiciones libres de suero que permiten altos niveles de expresión de CD16 y CD32B (datos no mostrados). En resumen, los monocitos purificados se cultivaron durante 6-8 días en Macrophage-SFM (Invitrogen) que contenía GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-10 e IL-1 β . Mientras que la incidencia de células CD32B+/CD16+ en estos cultivos es más alta usando una mezcla de citoquinas, las combinaciones de dos de más citoquinas también mejorarán la expresión de $\text{Fc}\gamma\text{R}$ (M-CSF/IL-6, M-CSF/IL-10; M-CSF/IL-1 β). Para los ensayos de ADCC, se añade $\text{IFN}\gamma$ para las 24-48 horas finales.

El ADCC basado en MDM requirió tiempos de incubación de >16 horas para observar la destrucción de células diana. Las células diana se cargaron con Indio-111 que se retiene para incubaciones largas dentro de las células diana. La liberación de indio se cuantificó usando un contador gamma. Todos los demás reactivos, Abs y células diana, fueron similares al ensayo de ADCC basado en PBMC. La actividad ADCC debida a $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ puede bloquearse eficazmente usando el anticuerpo antibloqueo FcRI (M21, Ancell). Las condiciones del ensayo difieren ligeramente del ensayo basado en PBMC. Objetivo 20:1 para efector; 18-14 h de incubación a 37°C.

Los mutantes Fc que muestran ADMC de PBMC mejorado, aumentaron la unión a $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ o disminución de la unión a $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ (figura 30).

6.12 Efecto de los mutantes de Fc en la actividad complementaria

Los mutantes Fc se identificaron originalmente basándose en su unión aumentada a $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$. Estos mutantes fueron posteriormente validados por su afinidad mejorada para todos los receptores de baja afinidad y en muchos casos mejoraron la actividad en ADCC mediada por PBMC. La citotoxicidad mediada por anticuerpos *in vivo* puede ocurrir a través de múltiples mecanismos. Además de ADCC, otros posibles mecanismos incluyen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y apoptosis. La unión de C1q a la región Fc de una inmunoglobulina se inicia como una cascada que da como resultado la lisis celular por CDC. La interacción entre C1q y la Fc ha sido estudiada en una serie de mutantes Fc. Los resultados de estos experimentos indican que C1q y FcR de baja afinidad se unen a regiones de superposición de la Fc, sin embargo, los residuos de contacto exactos dentro de la Fc varían.

Los mutantes que mostraron ADCC mejorado en el ensayo basado en PBMC se determinaron para su efecto en CDC. Los anticuerpos se analizaron en el antiCD20 Ch-mAb. 2H7. Detectamos CDC mejorado para cada mutante ch-mAb probado. Curiosamente, a pesar de que estos mutantes fueron seleccionados por su ADCC mejorado

también muestran CDC mejorados.

5 Materiales y métodos. El ensayo de CDC se usó para probar los mutantes Fc usando células anti-CD20 y Daudi como dianas. Se utilizó suero de cobaya como fuente de complemento (US Biological). El ensayo CDC fue similar a ADCC basado en PBMC. Las células diana se cargaron con europio y se opsonizaron con ChMAb. Sin embargo, el
 10 complemento, suero de cobaya, se añadió en lugar de células efectoras. La figura 31 muestra un diagrama de flujo del ensayo. Se tituló Anti-CD20 ChMAb en más de 3 órdenes de magnitud. Se calculó la lisis. Se marcaron células Daudi, (3×10^6) con reactivo BADTA. 1×10^4 células se dividieron en alícuotas en pozos en una placa de 96 pozos. Los anticuerpos se titularon en los pozos usando diluciones de 3 veces. Se dejó que la reacción de opsonización prosiguiera durante 30-40 minutos a 37°C en CO₂ al 5%. Se añadió suero de cobaya a una concentración final del
 15 20%. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 3.5 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Posteriormente, se añadieron 100 µls de medio celular a la reacción y las células se centrifugaron. Para la detección se añadieron 20 µls del sobrenadante a 200 µls de la solución de Europio y las placas se leyeron en el Victor2 (Wallac).

Resultados: Todos los mutantes que muestran una unión mejorada para activar FcR o C1q se colocaron en el ensayo CDC (figura 32). Los mutantes Fc que mostraron una unión mejorada a Fc γ RIIIA también mostraron una actividad de complemento mejorada. Cada uno de los mutantes mostró una actividad de complemento mejorada en comparación con el tipo salvaje. Los mutantes probados son mutantes dobles. En cada caso una de las mutaciones presentes es P396L.

Para determinar si el aumento de CDC correlacionado con el aumento de la unión de C1q a IgG1 Fc se midió la unión entre las dos proteínas en tiempo real utilizando resonancia de plasmón de superficie. Con el fin de examinar la unión entre C1q y una IgG1, las variantes de Fc se clonaron en un mAb ch-2 anti-CD32B, 2B6. Esto nos permitió capturar los anticuerpos wt y mutantes a la lámina de vidrio a través de la proteína CD32B soluble (figura 34A). Tres de los cuatro mutantes probados en CDC también fueron examinados en el Biacore. Los tres mostraron K_{apagado} en gran medida mejorado que el Fc de tipo salvaje (figura 34B). El formato Biacore para la unión de C1q a mutantes 2B6 demuestra una unión mejorada de mutantes con la mutación P396L (figura 35). La mutación D270E puede reducir el enlace C1q en diferente medida. Un resumen del análisis cinético de Fc γ R y la unión C1q se representa en la tabla 25 a continuación.

Tabla 25. Análisis cinético de unión de Fc γ R y C1q al mutante 2B6

Mutantes 2B6	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl	C1q
WT	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	0.28	0.033	0.028	0.078
MgFc31/60	0.084	0.238	0.094	0.127	0.034	0.210
MgFc51/60	0.112	0.293	0.077	0.089	0.028	0.079
MgFc55/60	0.113	0.288	0.078	0.099	0.025	0.108
MgFc59/60	0.105	0.296	0.078	0.095	0.024	0.107

6.13 Diseño de variantes Fc con unión reducida a Fc γ RIIB

30 Basándose en una selección de mutantes Fc que reducen la unión a Fc γ RIIB y aumentan la unión a Fc γ RIIA 131H se identificó un número de mutaciones que incluían D270E. Cada mutación se ensayó individualmente para la unión a los receptores Fc de baja afinidad y sus variantes alélicas.

El D270E tenía las características de unión que sugerían que reduciría específicamente la unión a Fc γ RIIB. El D270E se ensayó en combinación con mutaciones que se identificaron previamente basándose en su unión mejorada a todos los FcR.

35 Resultados. Como se muestra en las Tablas 26 y 27 y las figuras 36 y 37 de la mutación D270E mejora la unión de Fc γ RIIIA y Fc γ RIIA H131 y reduce la unión a Fc γ RIIB. La figura 38 muestra el gráfico de los datos MDCC ADCC frente al K_{apagado} como se determina para la unión de CD32A H131H para mutantes seleccionados.

Tabla 26. La adición de la mutación de D270E mejora la unión de Fc γ RIIA y Fc γ RIIA H131 y reduce la unión de Fc γ RIIB

Mutantes 4B5	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
Wt pure	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	0.116	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	0.021
MgFc38/60	0.089	0.232	0.101	0.093	0.032

Tabla 27. Características cinéticas de mutantes 4D5

Mutantes 4B5	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

5

Listado de secuencias

<110> MacroGenics, Inc.

<120> Identificación e ingeniería de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de utilización de los mismos

<130> 11183-020-228

- <140> para ser asignado
 <141>
 <150> 10/902,588
 <151> 2004-07-28
- 5 <150> 10/754,922
 <151> 2004-01-09
 <150> 60/439,498
 <151> 2003-01-09
 <150> 60/456,041
- 10 <151> 2003-03-19
 <150> 60/514,549
 <151> 2003-10-23
 <160> 10
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 15 <210> 1
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 20 <223> Cebador: 5' linker.avitag
 <400> 1
 ggccgcaggt ggtggtggtt ctggtggtgg tggttctggt ctgaacgaca tcttcgaggc 60
 tcagaaaatc gaatggcacg aatgat 86
- <210> 2
 <211> 86
- 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: 3' linker.avitag
 <400> 2
 ctagatcatt cgtgccattc gattttctga gcctcgaaga tgtcgttcag accagaacca 60
 ccaccaccag aaccaccacc acctgc 86
- 30 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>

<223> Cebador: FcR3A izquierdo
 <400> 3
 gttggatcct ccaactgctc tgctactct agtt 35
 <210> 4
 5 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: FcR3A Derecho
 10 <400> 4
 gaaaagctta aagaatgatg agatggttga cact 34
 <210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: FcR2B derecho
 <400> 5
 gaagtcgaca atgatcccca ttggtgaaga g 31
 20 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador: FcR2B izquierdo
 <400> 6
 gttagatctt gctgtgctat tcctggctcc 30
 <210> 7
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: IgG1 derecho
 <400> 7
 35 atagtcgacc actgatttac ccggaga 27
 <210> 8
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: IgG1 izquierdo
 5 <400> 8
 ggaattcaac accaagggtgg acaagaaagt t 31
 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador: mcr025;ch1 (f)
 <400> 9
 aaaggatccg cgagctcagc ctccaccaag g 31
 15 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador: H021
 <400> 10
 gtctgctcga agcattaacc 20

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene una región Fc de IgG1 humana variante en la que dicha región Fc variante:
 - (A) contiene un dominio CH2 y un dominio CH3;
 - (B) posee una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de una región Fc de tipo salvaje porque comprende modificaciones de aminoácidos seleccionadas relativas a dicha región Fc de tipo salvaje, donde dichas modificaciones de aminoácidos seleccionadas comprenden R292P y V305I,

en el que dicha numeración es la del índice de la UE como en Kabat y en donde dichas sustituciones de aminoácidos seleccionadas hacen que dicha región Fc variante se una a Fc γ R11A con una afinidad incrementada con respecto a la de dicha región Fc de tipo salvaje.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha región Fc variante tiene modificaciones de aminoácidos que consisten en R292P, V305I y F243L en comparación con dicha región Fc de tipo salvaje.
3. El polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho polipéptido es un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo que contiene dicha región Fc variante.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es el anticuerpo producido por el clon de hibridoma: 1D5 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5958, 1F2 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5959, 2D11 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5960, 2E1 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5961 o 2H9 que tiene el número de acceso ATCC PTA-5962.
5. El uso del anticuerpo, o de su fragmento, de la reivindicación 3 o 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, en el que dicho anticuerpo, o dicho fragmento del mismo, se une a dicho antígeno de cáncer.
6. El anticuerpo, o dicho fragmento del mismo, de la reivindicación 3 o 4 para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, en el que dicho anticuerpo, o dicho fragmento del mismo, se une a dicho antígeno de cáncer.
7. El uso, el anticuerpo para uso o el fragmento para uso según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho antígeno de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: antígeno de carcinoma de KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA125), fosfato de ácido prostático, antígeno prostático específico, antígeno p97 asociado al melanoma, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos grasos de leche humana, antígenos asociados al tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-I y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19, antígeno de linfoma B-CD20 humano, CD33, antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3, tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA), tales como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo virus de tumores de ADN de antígeno T y antígenos de envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga, antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20, 5 antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37, neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno linfocítico humano maligno APO-1, antígeno de diferenciación como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 se encuentran en el epitelio de mama, SSEA-I encontrado en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D₅6-22 se encuentran en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, Y hapteno, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor EGF encontrado en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor EGF (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en el adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-I, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario, SSEA-3, SSEA-4 encontrado en embriones de fase celular 4-8 y el péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneo.
8. El uso, el anticuerpo para uso, o el fragmento para uso según las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicho antígeno de cáncer es característico de un carcinoma de mama, ovario, próstata, cervical o pancreático.
9. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de

cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o 2.

5 12. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena que comprende la región Fc variante del anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.

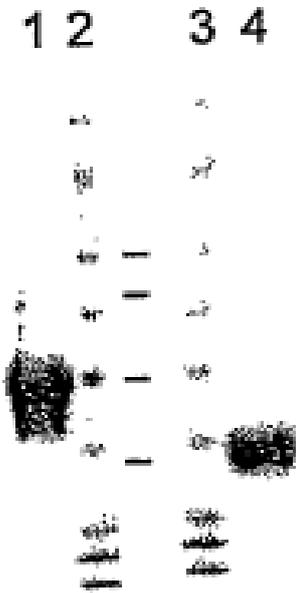


FIG. 1

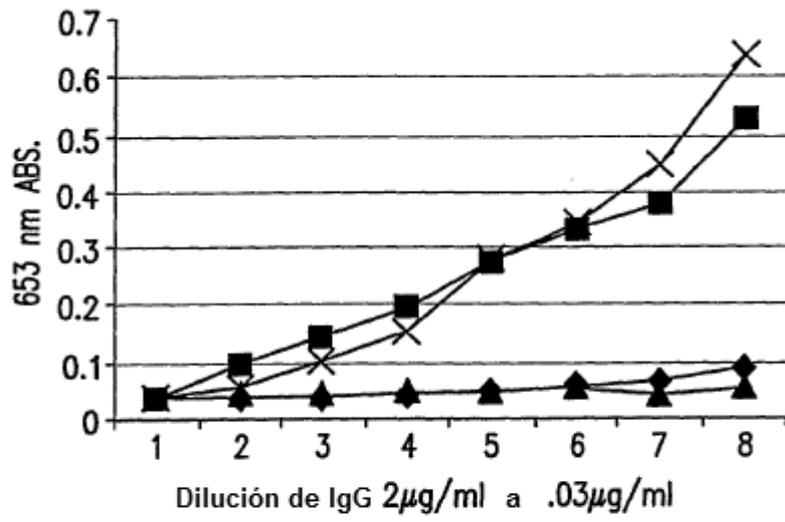


FIG.2

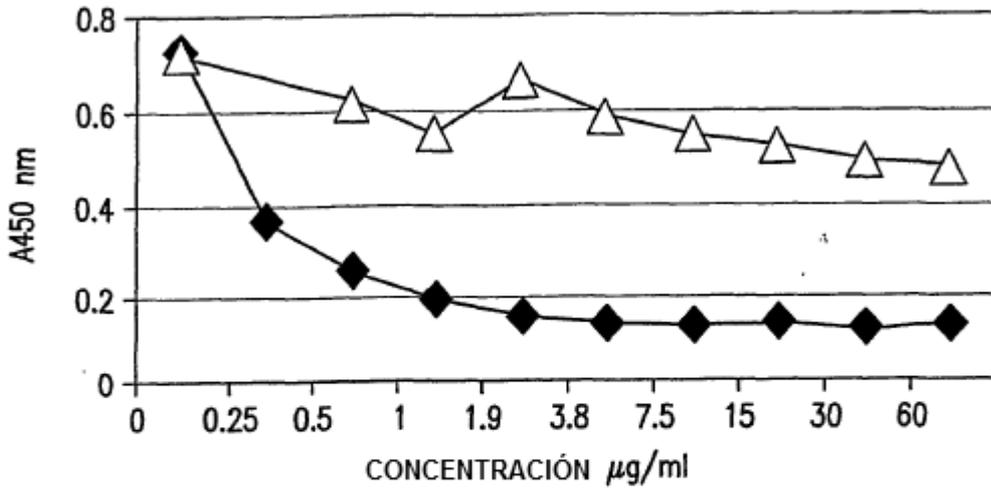


FIG.3A

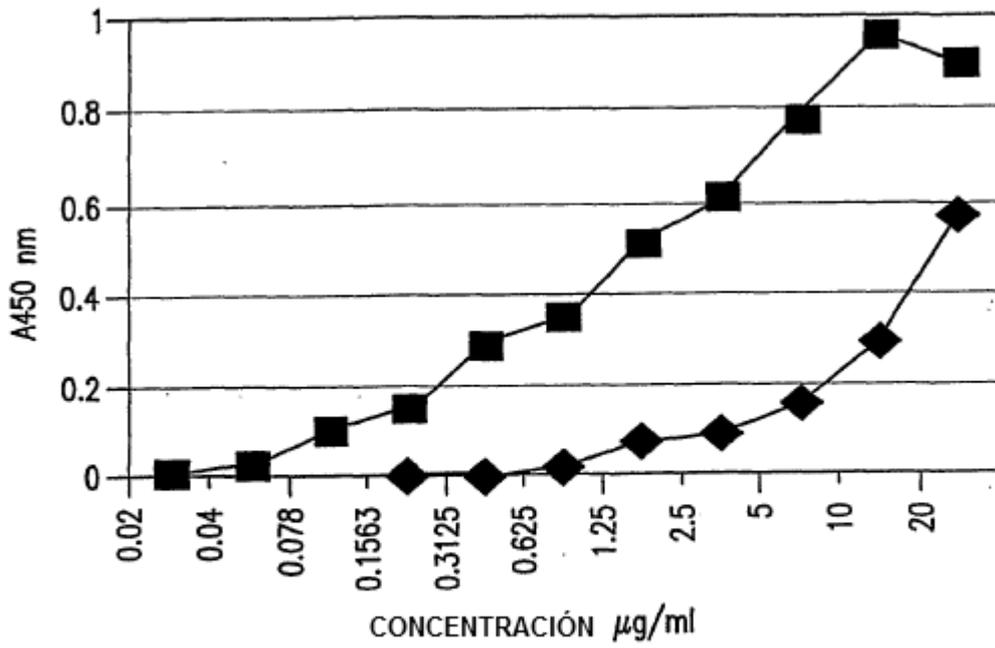


FIG.3B

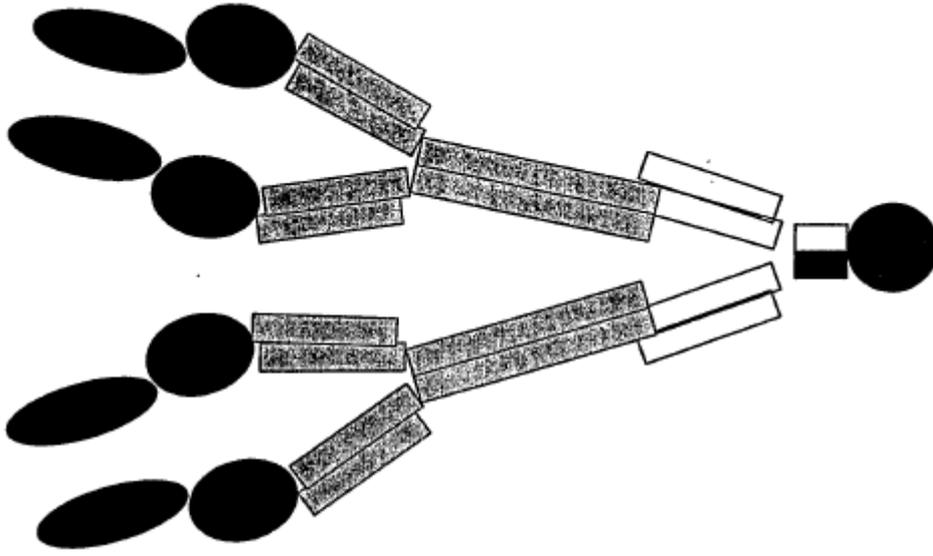


FIG. 4A

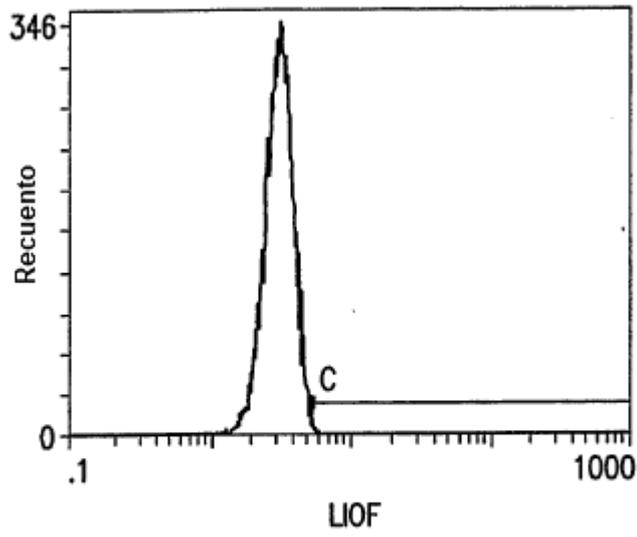


FIG. 4B-A

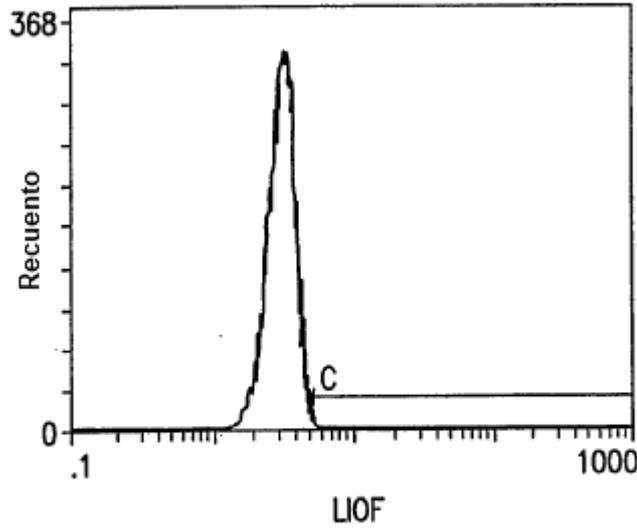


FIG. 4B-B

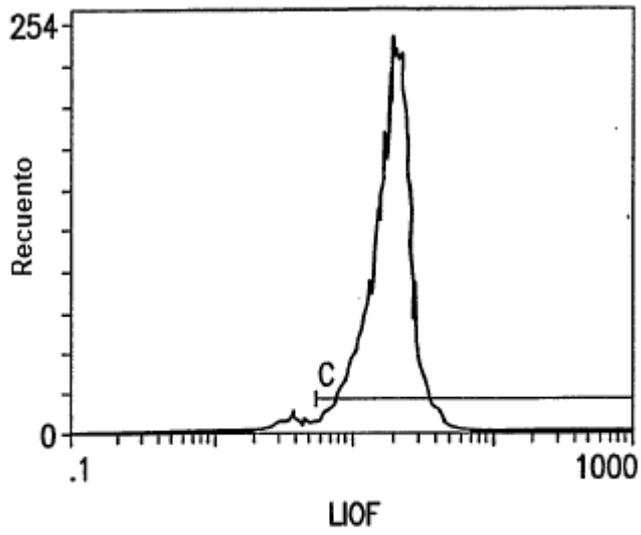


FIG. 4B-C

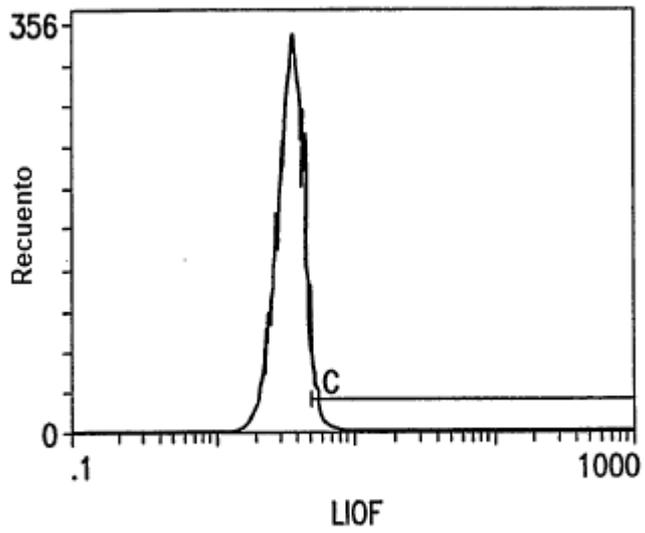


FIG. 4B-D

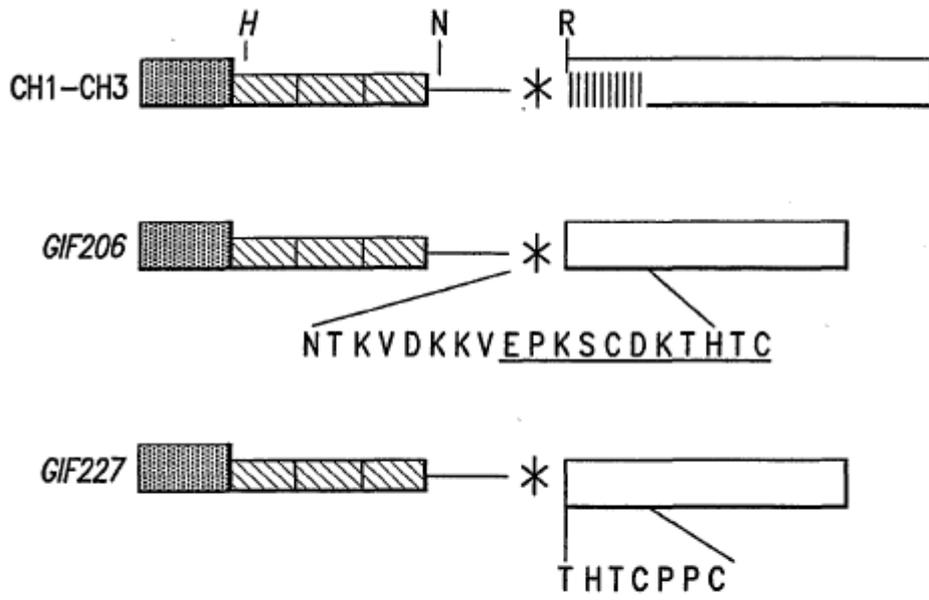


FIG.5

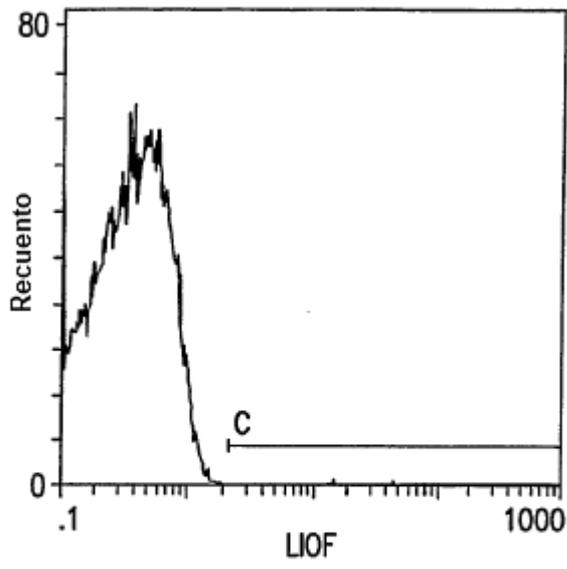


FIG. 6A

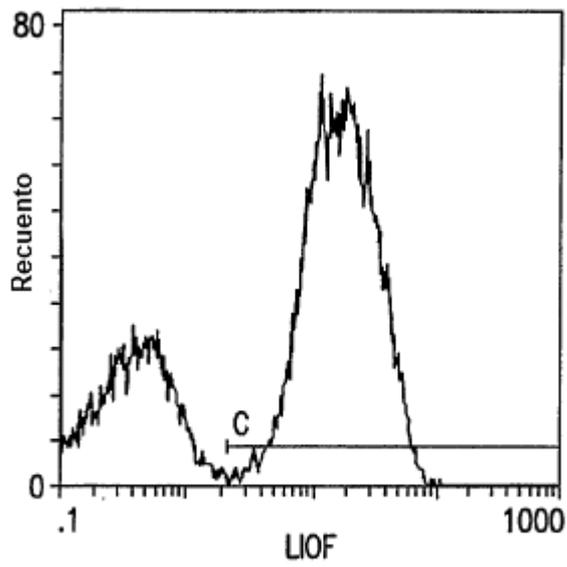


FIG. 6B

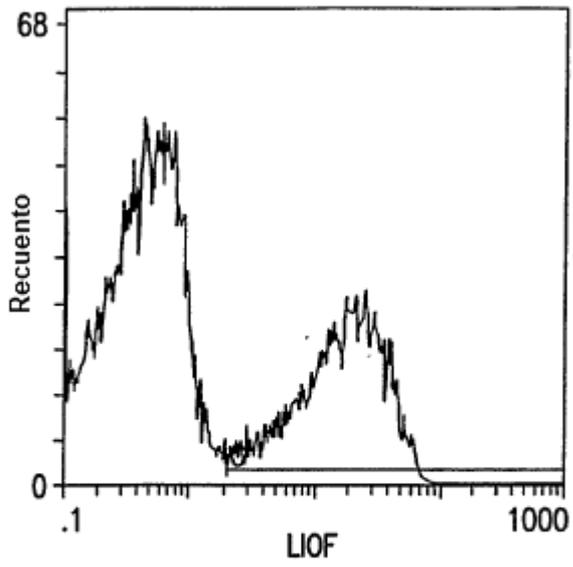


FIG. 6C

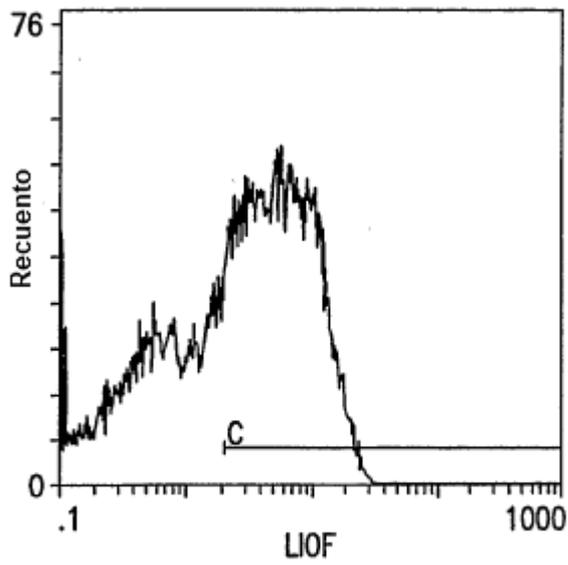


FIG. 6D

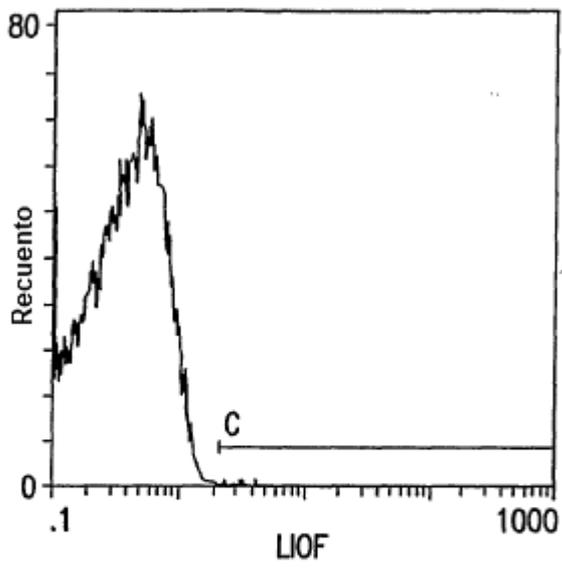


FIG. 6E

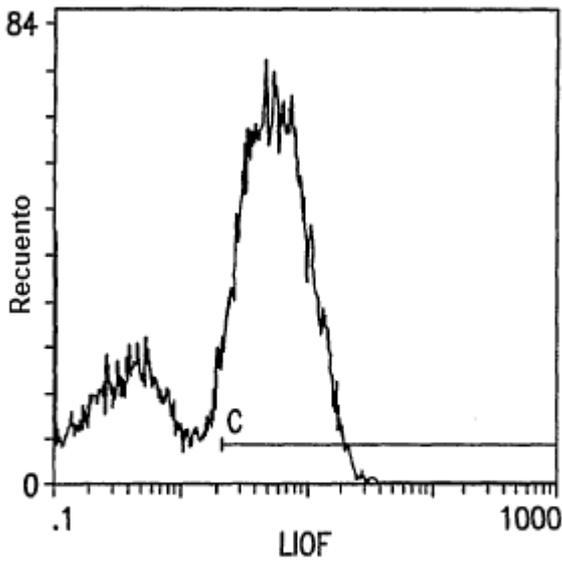


FIG. 6F

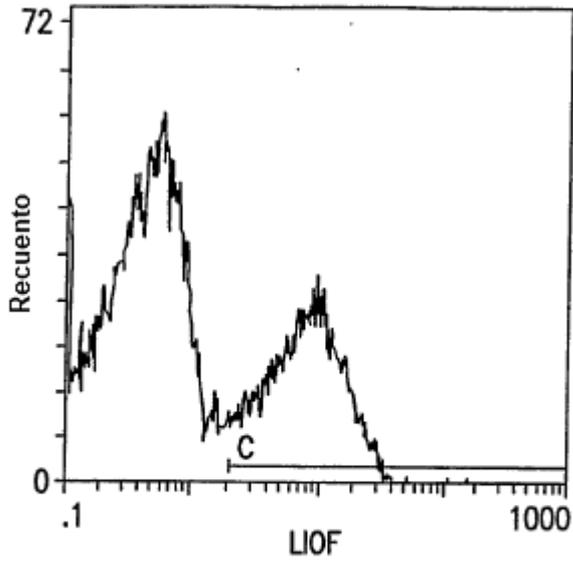


FIG. 6G

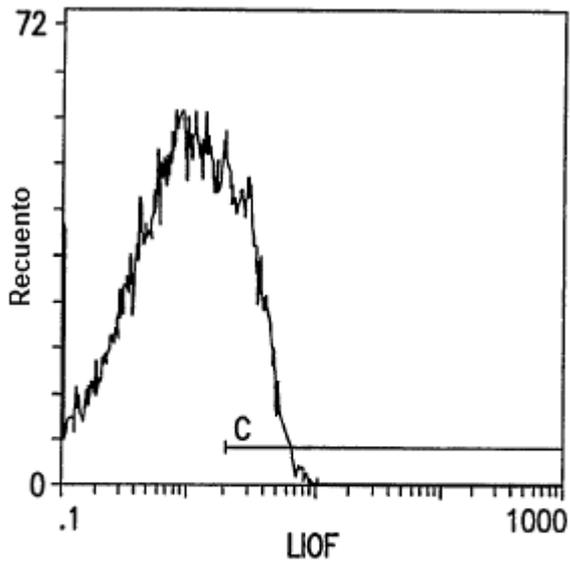


FIG. 6H

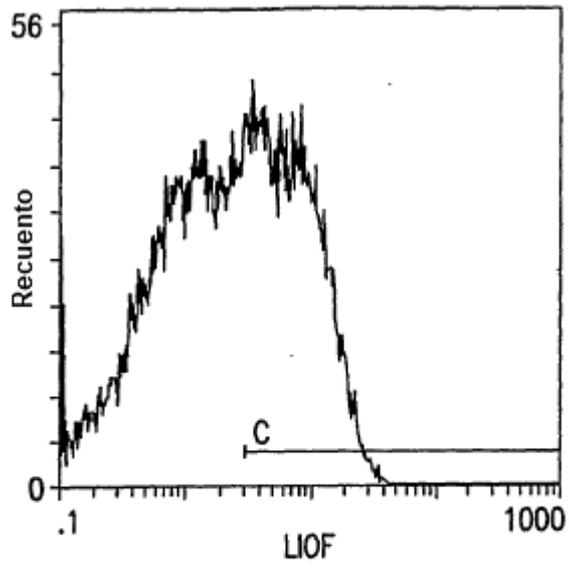


FIG. 7A

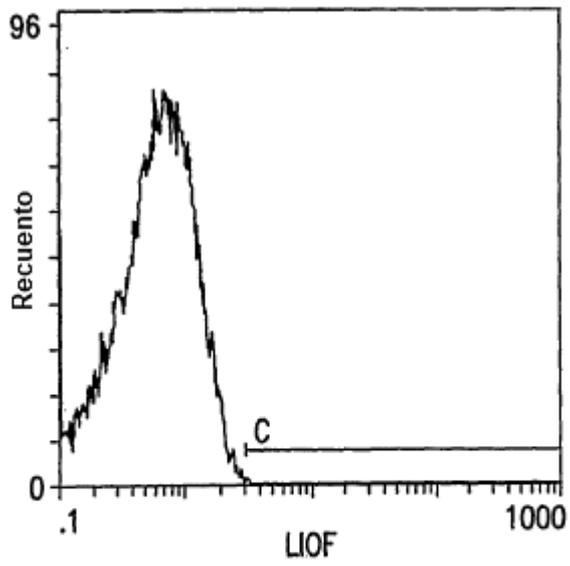


FIG. 7B

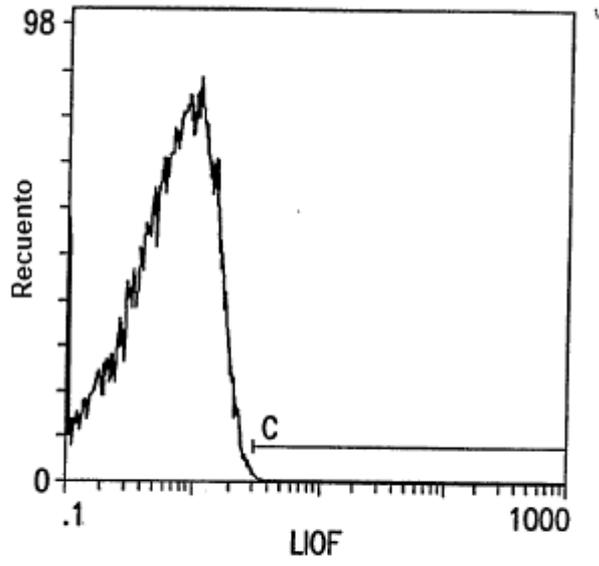


FIG.7C

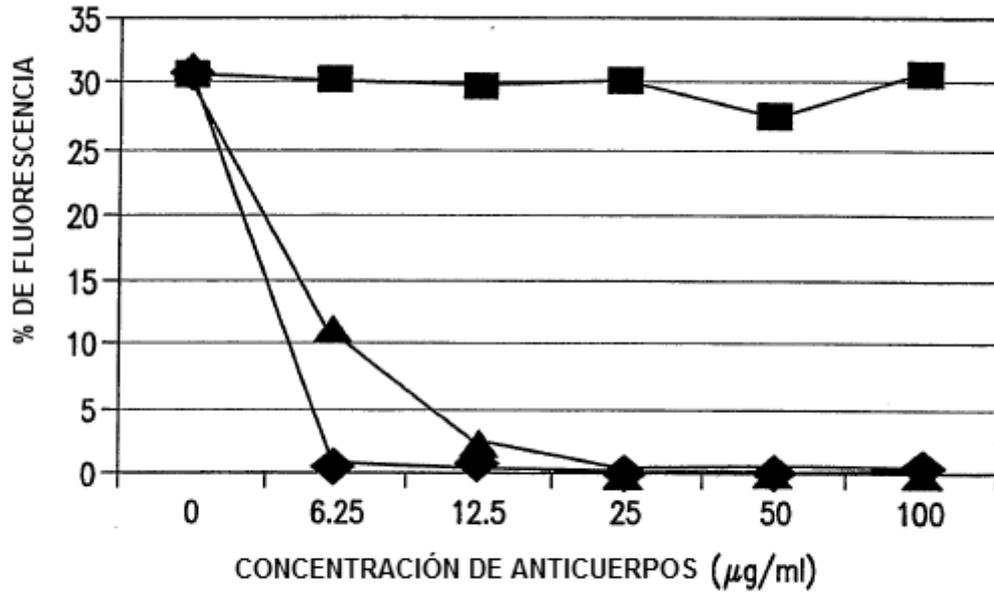


FIG.8

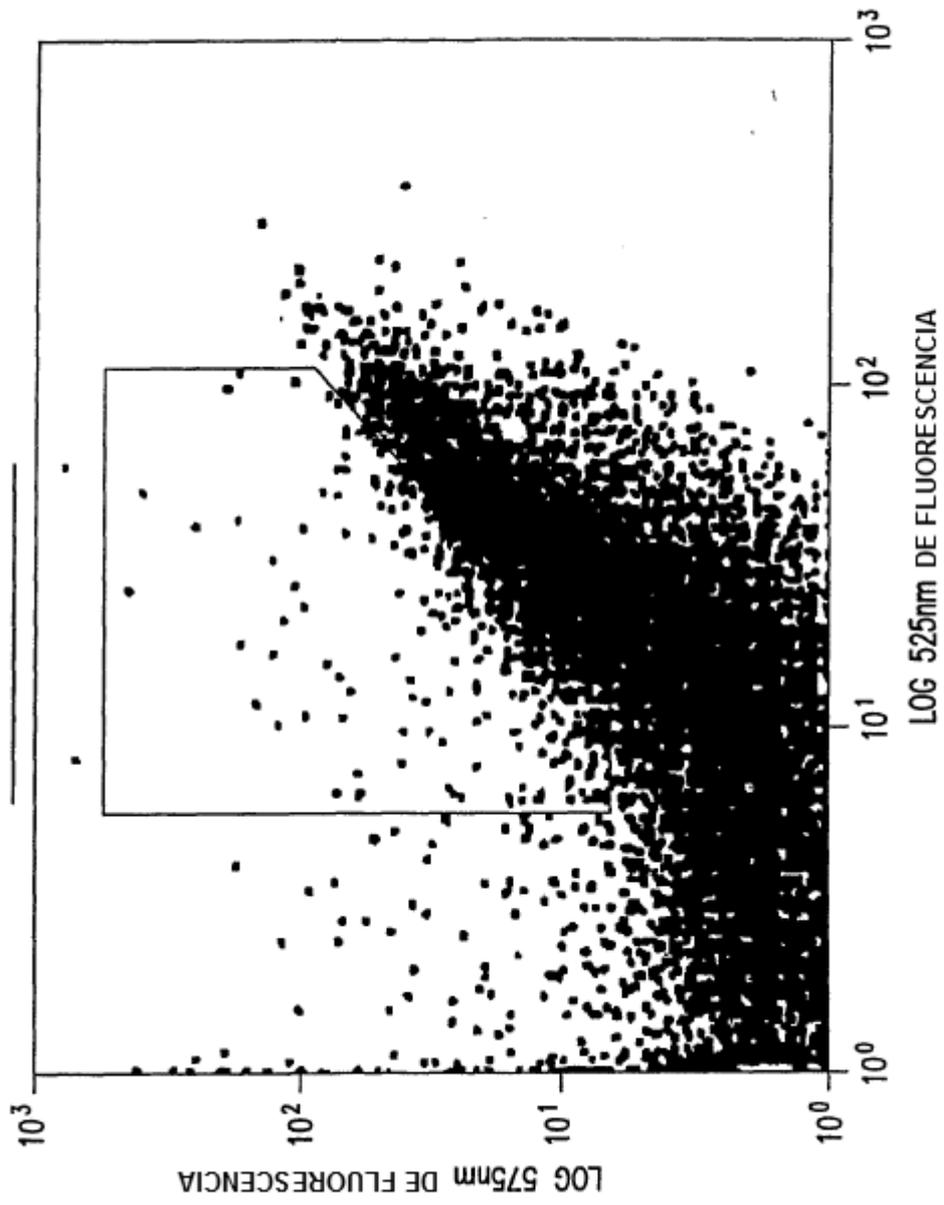


FIG.9

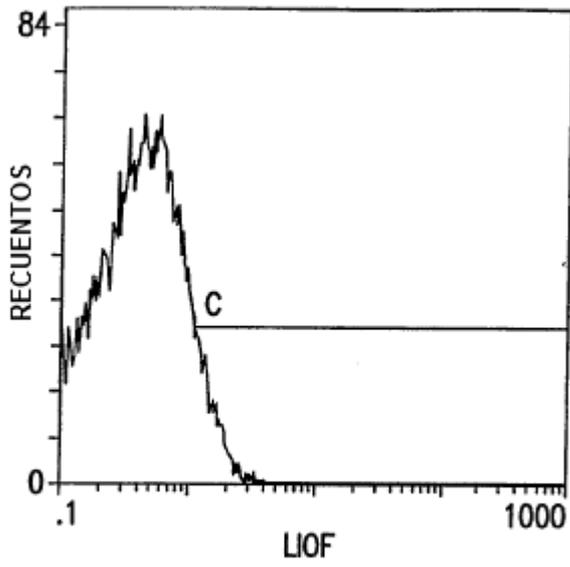


FIG. 10A

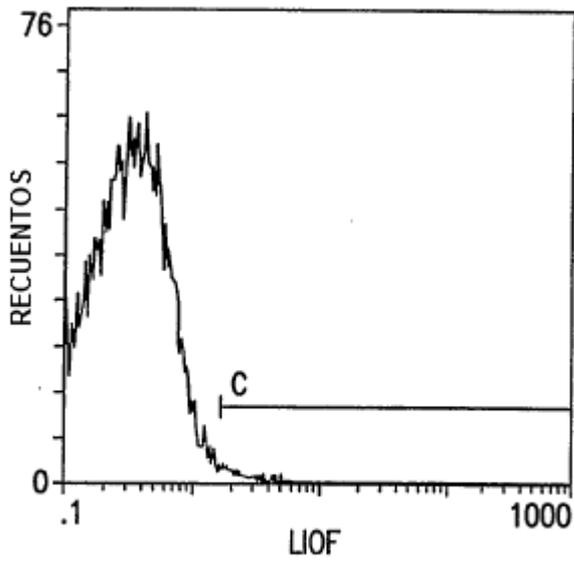


FIG. 10B

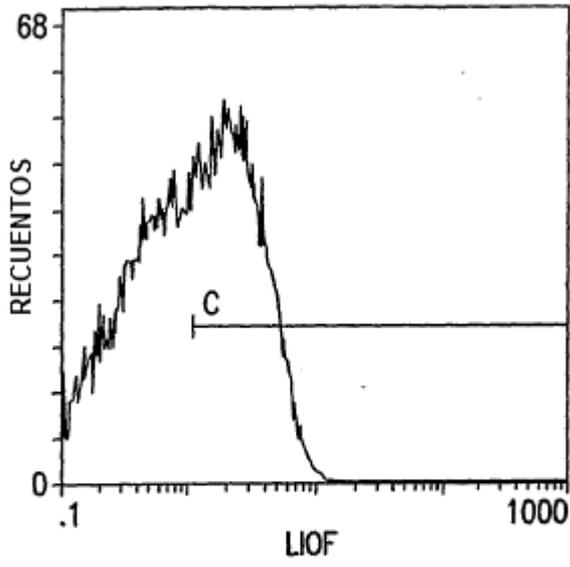


FIG. 10C

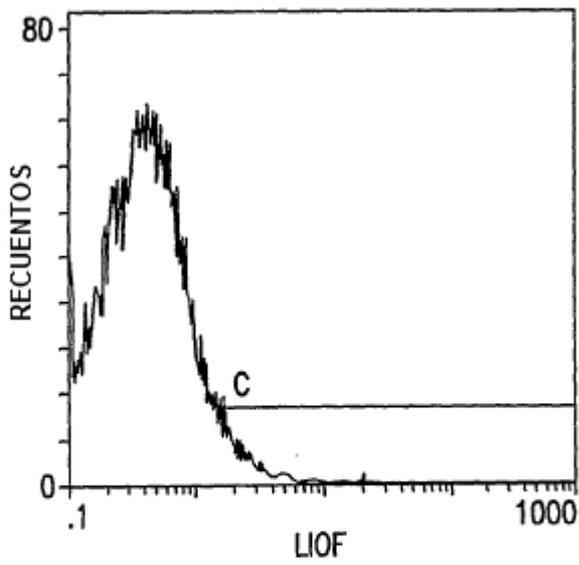


FIG. 10D

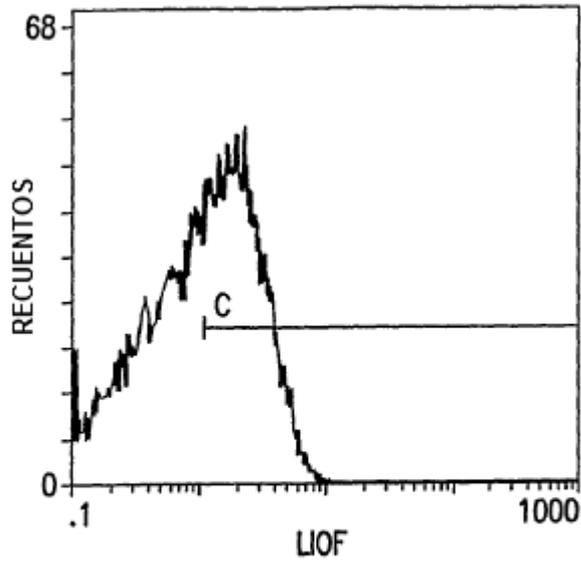


FIG. 10E

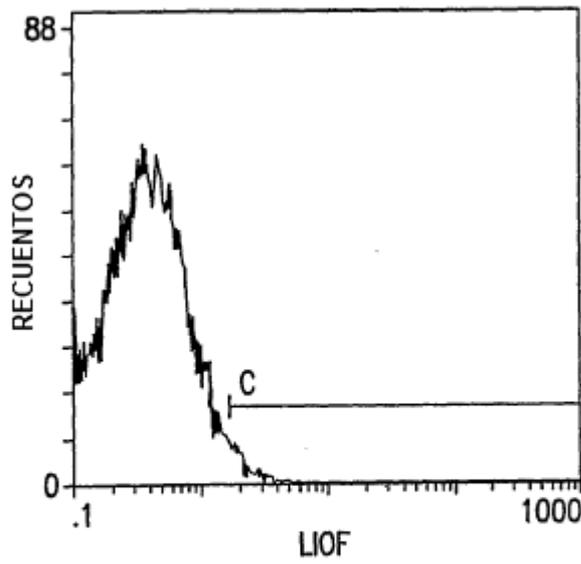


FIG. 10F

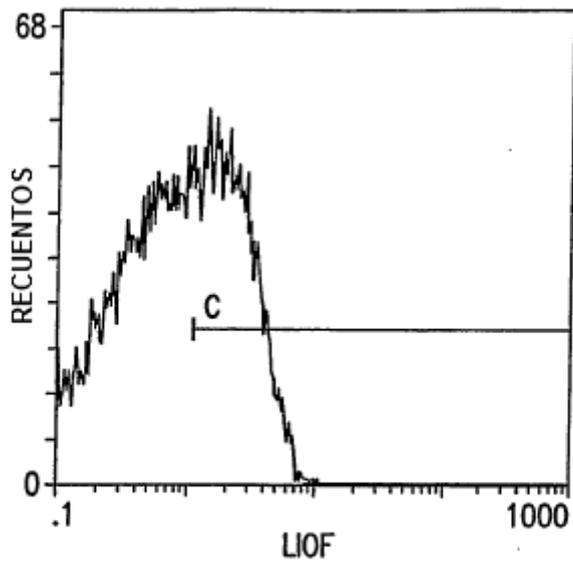


FIG. 10G

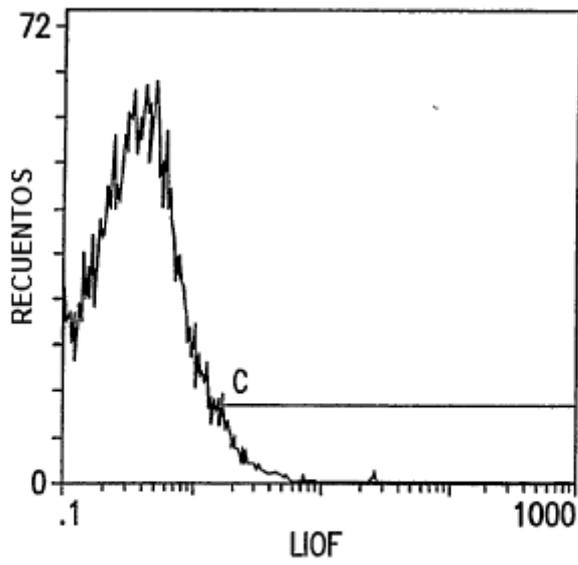


FIG. 10H

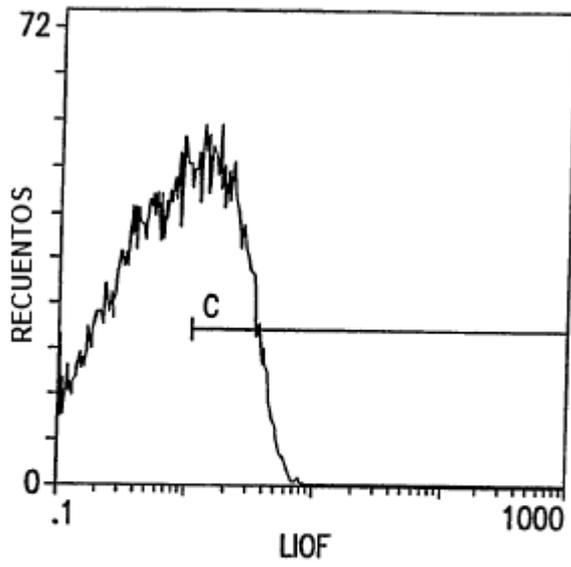


FIG. 10I

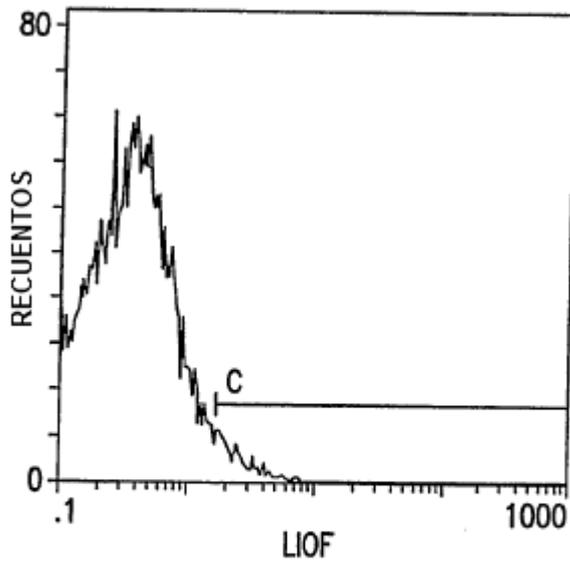


FIG. 10J

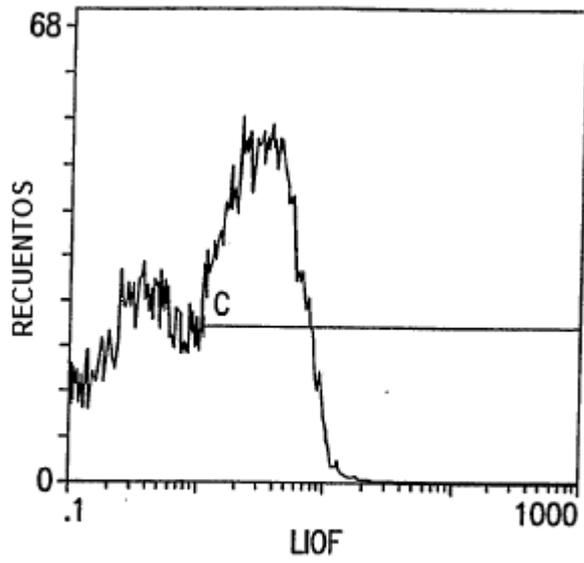


FIG. 10K

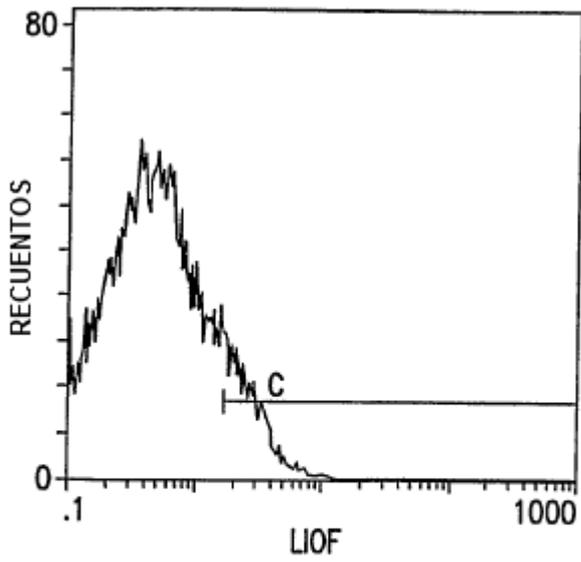


FIG. 10L

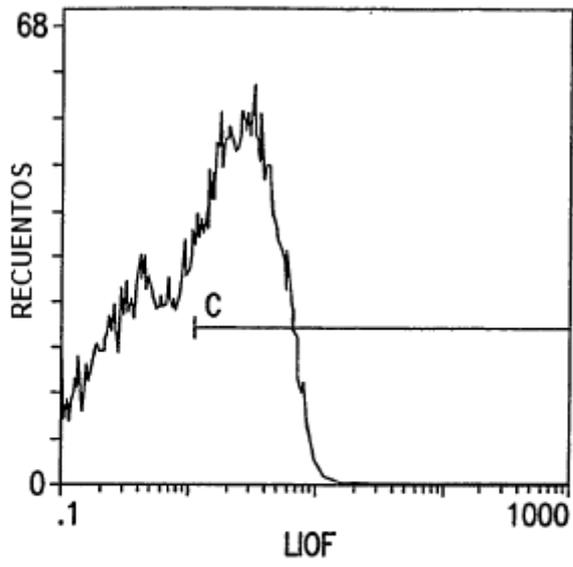


FIG. 10M

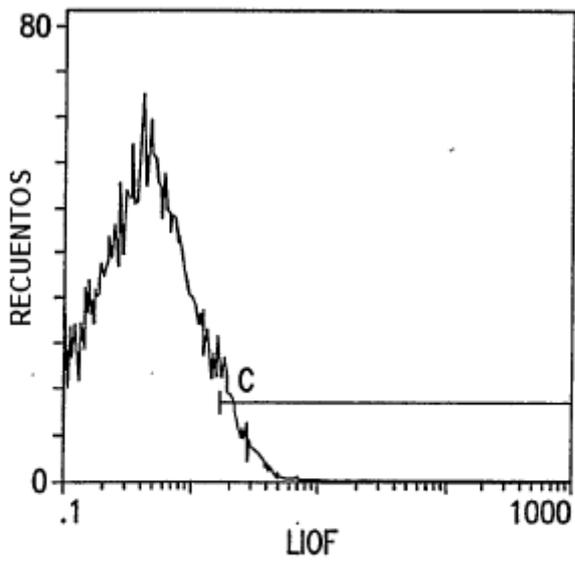


FIG. 10N

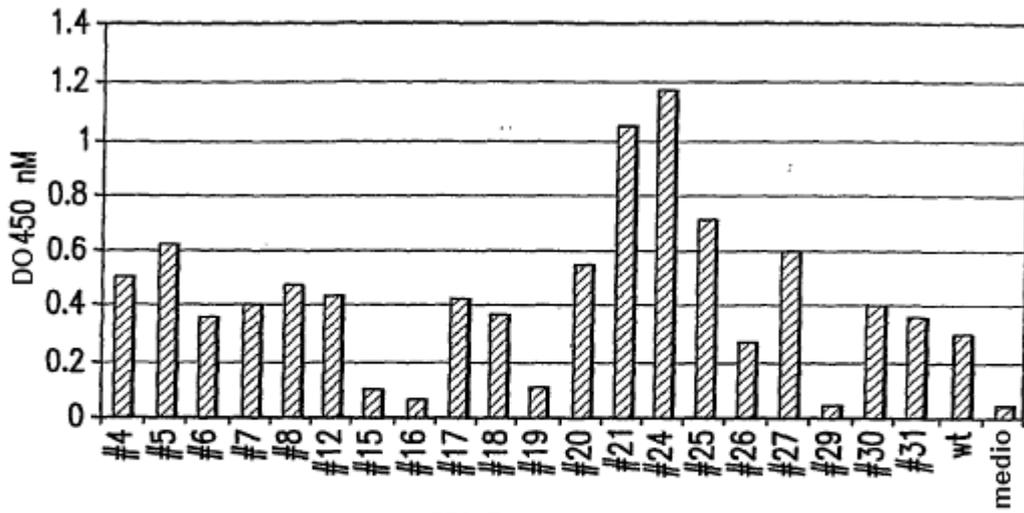


FIG. 11A

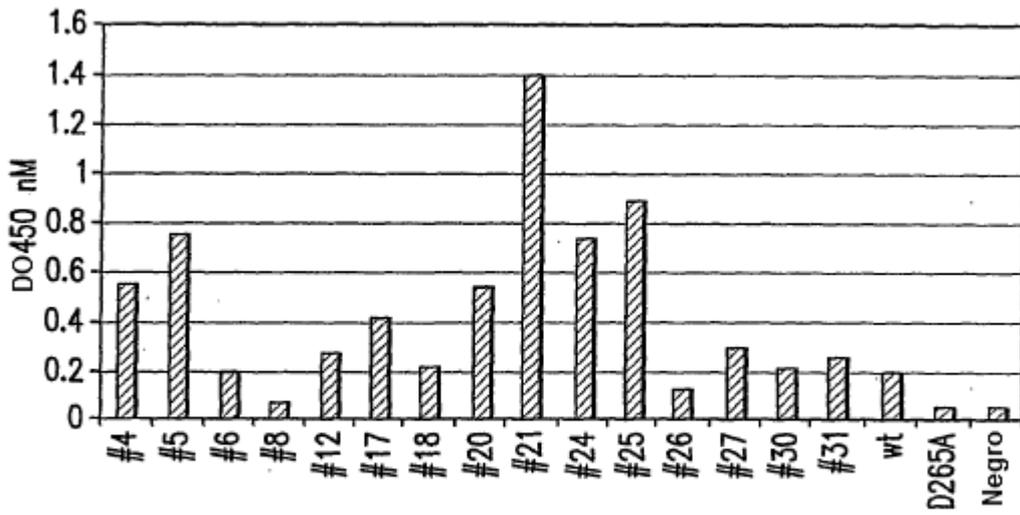


FIG. 11B

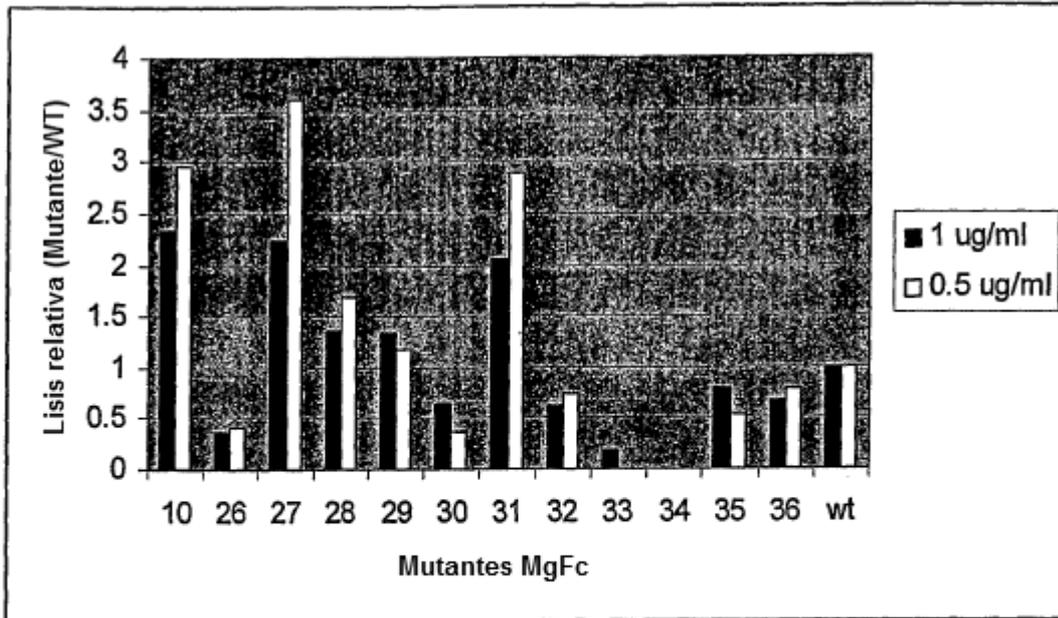


FIG. 12

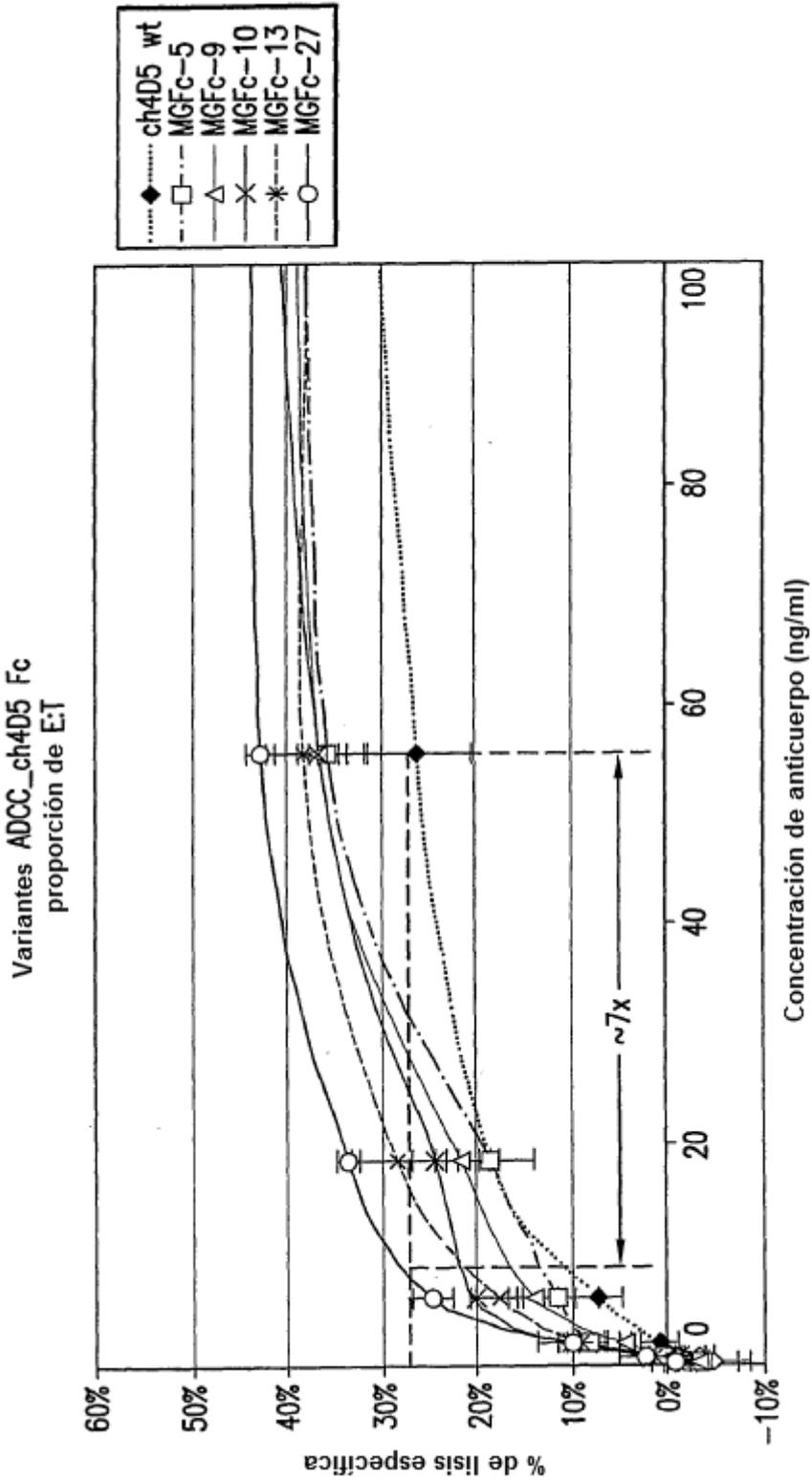


FIG.13A

Variantes ADCC_ch4D5 Fc
proporción de E:T 50:1

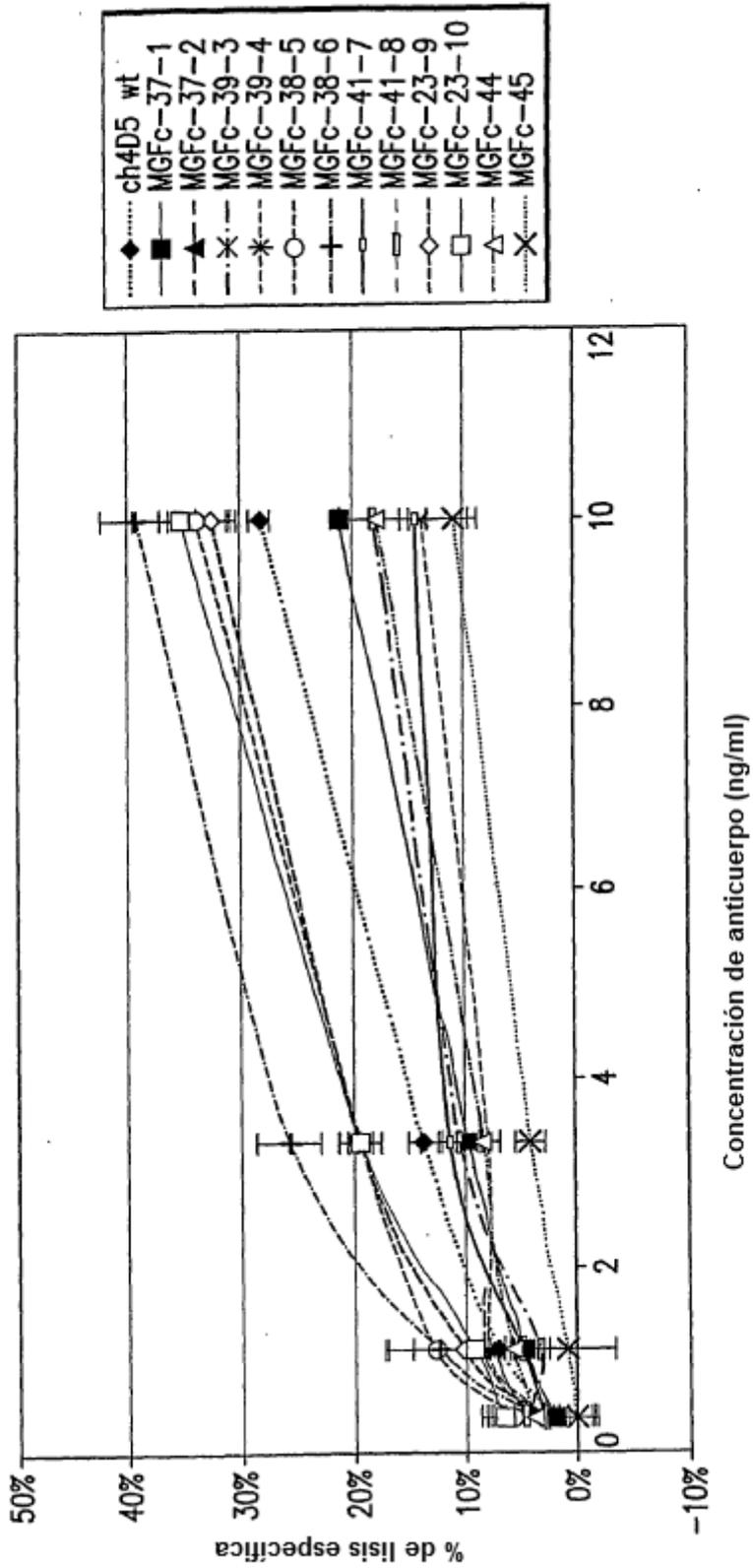


FIG.13B

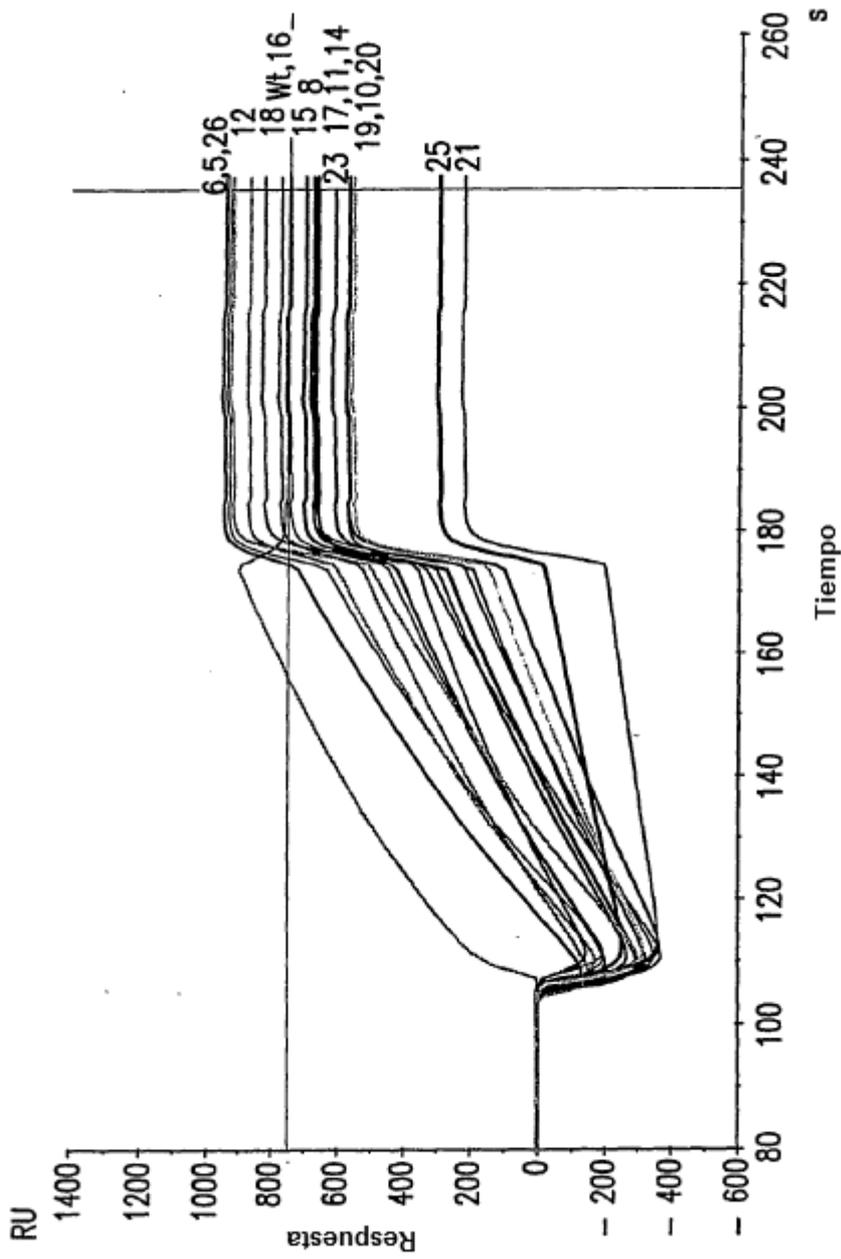


FIG.14

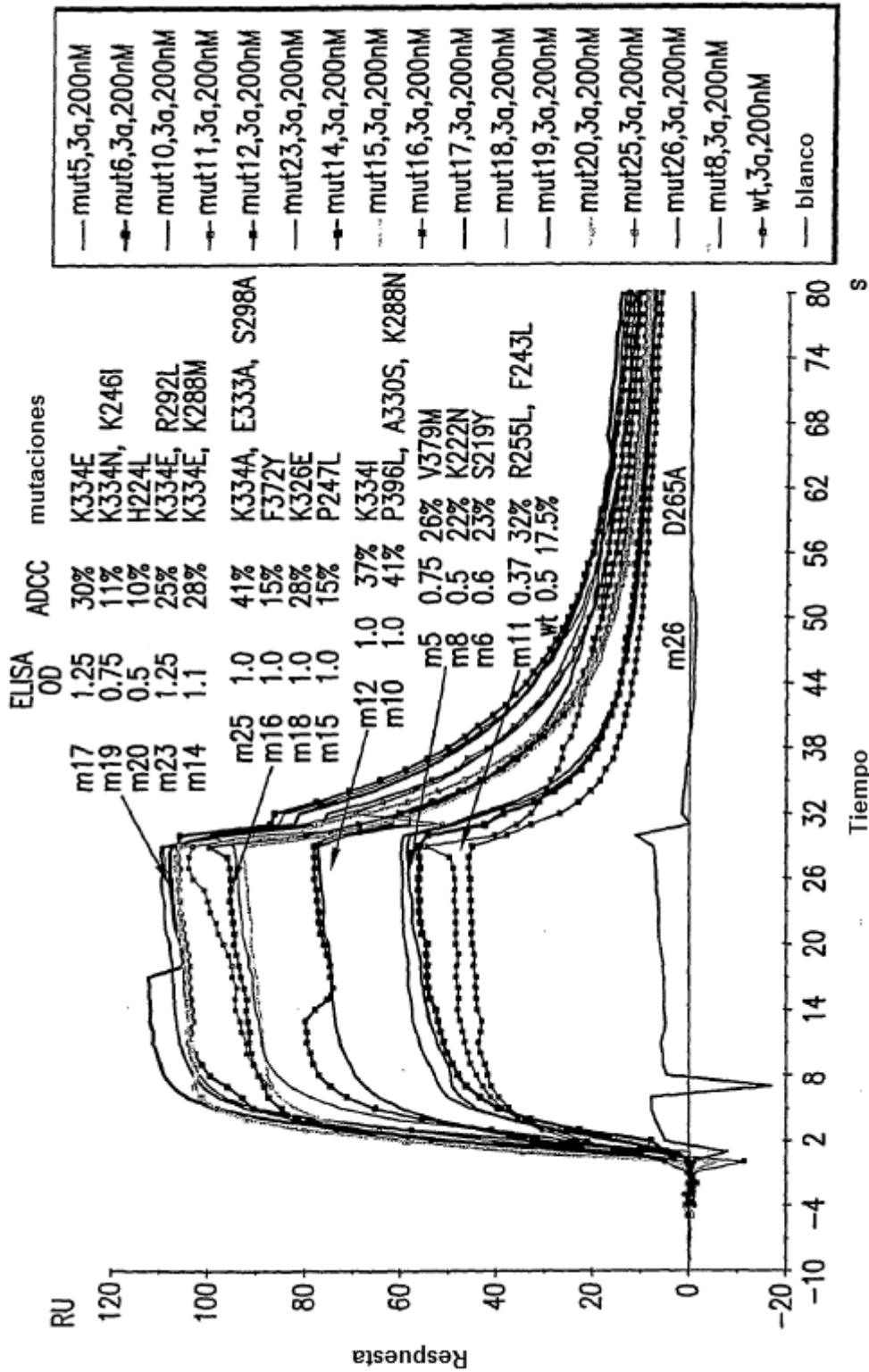


FIG.15

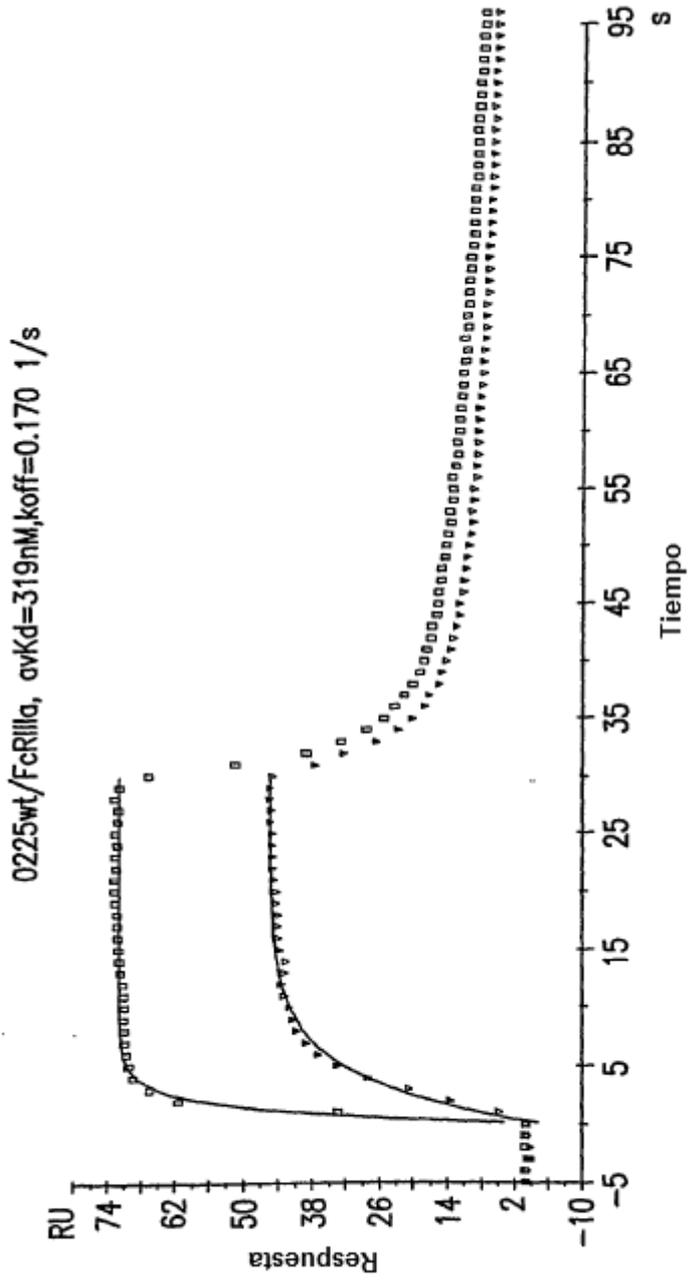


FIG.16A

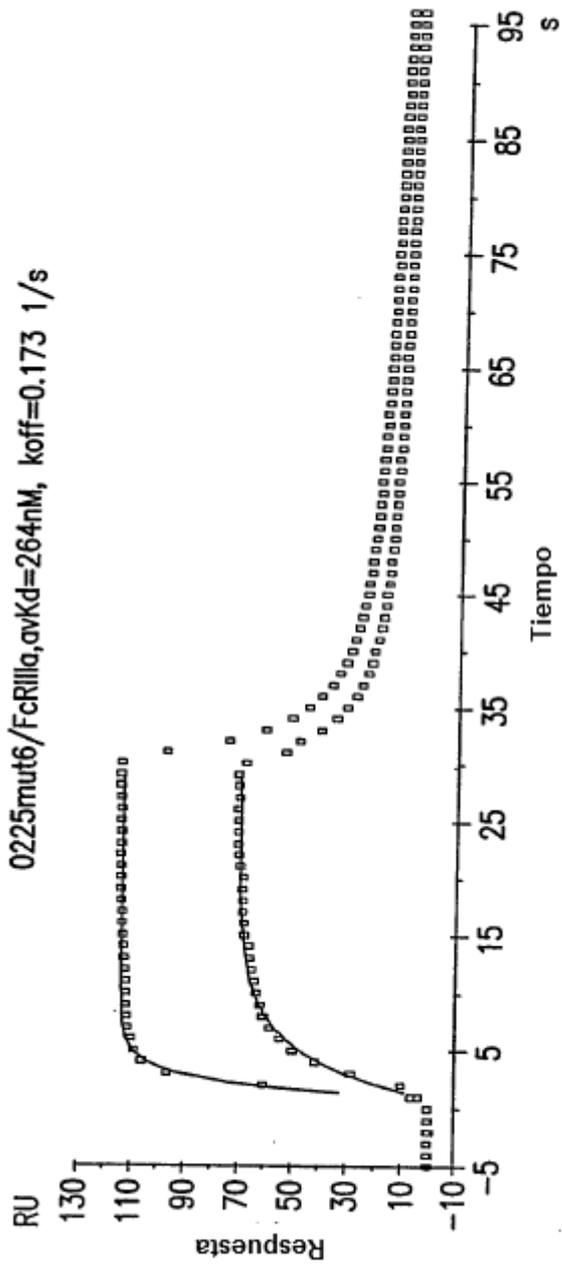


FIG.16B

0225mut10/FcR111a,avKd=128nM,koff=0.115 1/s

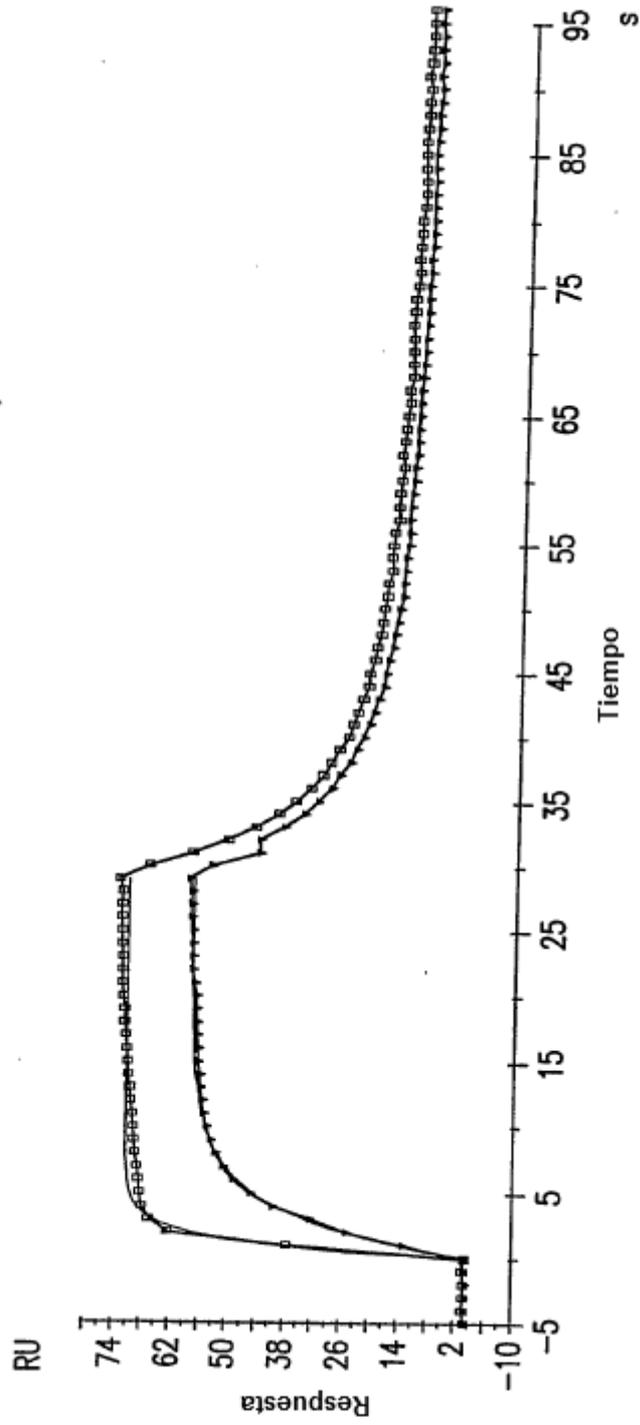


FIG.16C

0225mut11FcR1IIa, avKd=91.8nM, koff=0.073 1/s

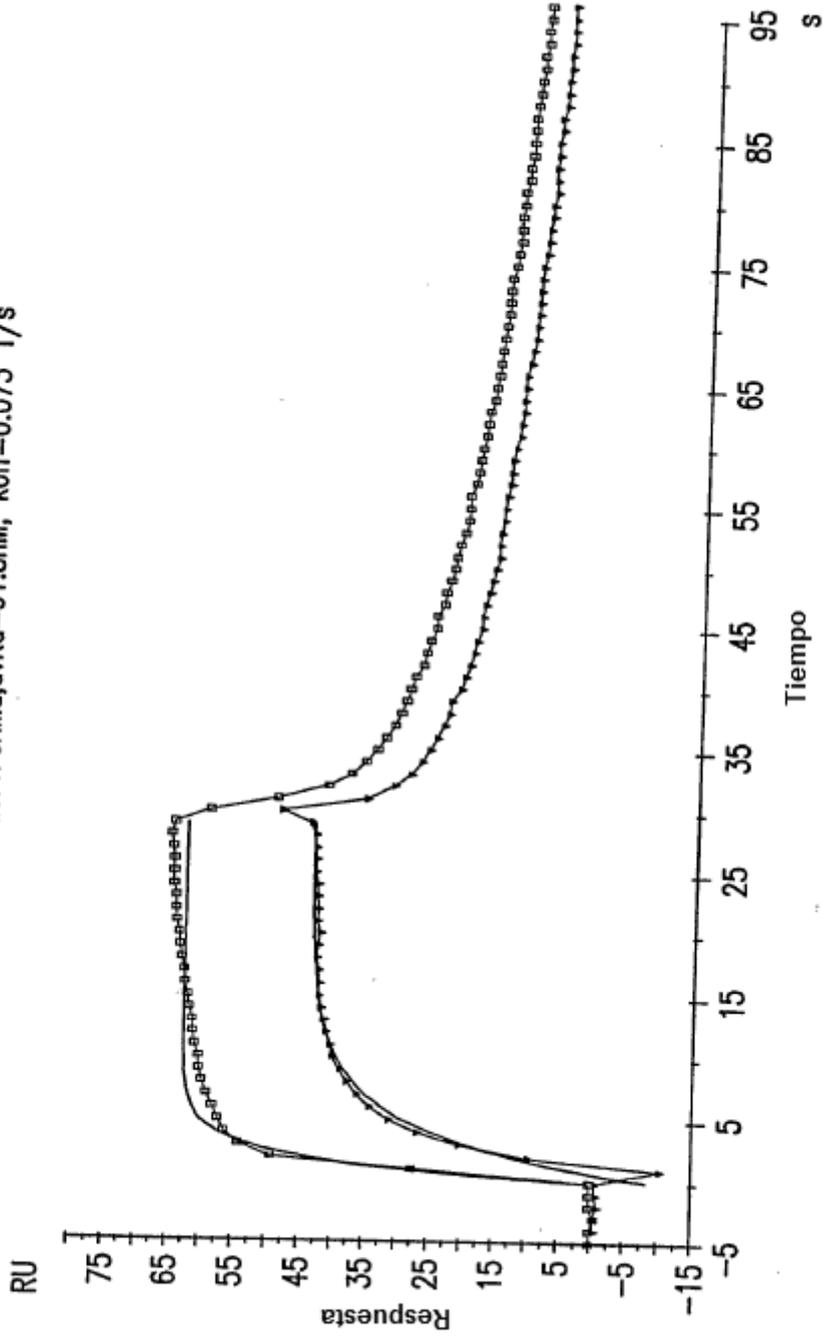


FIG.16D

0225mut18/FcRIIIa,avKd=92nM, koff=0.112 1/s

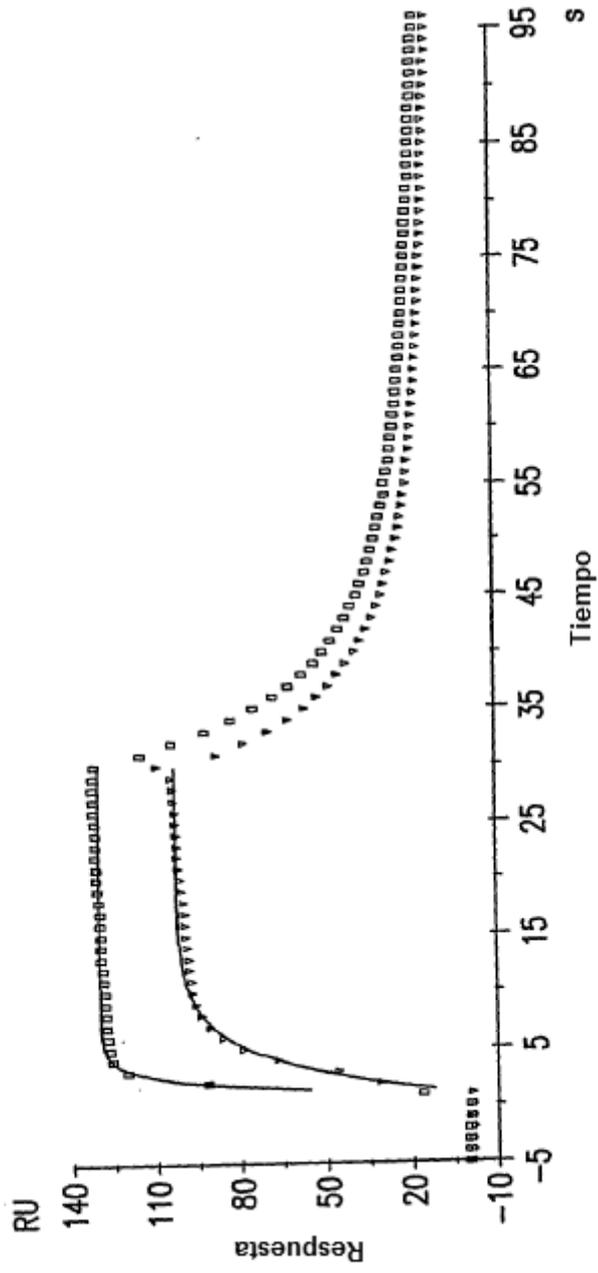


FIG. 16E

0225mut14/FcRIIIa,avKd=75.4nM,koff=0.1 1/s

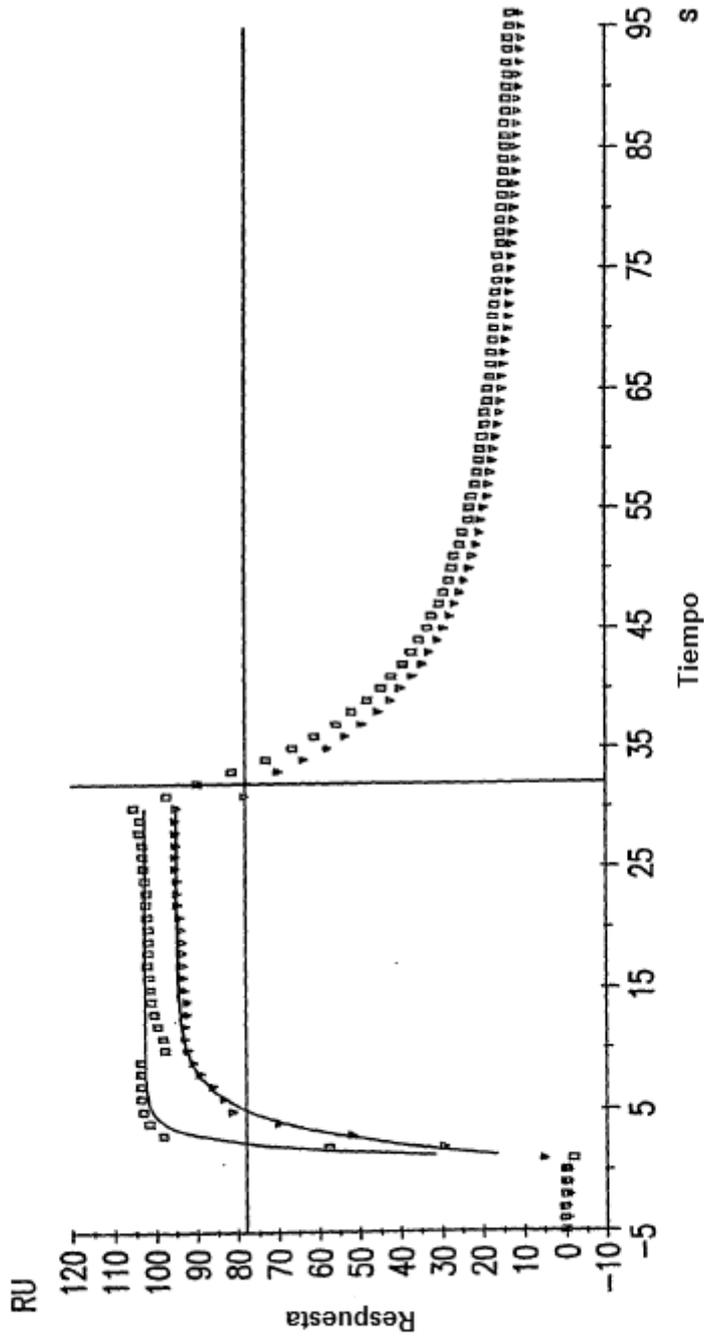


FIG.16F

0225mut16/FcR1IIa,avKd=84.8nM,koff=0.133 1/s

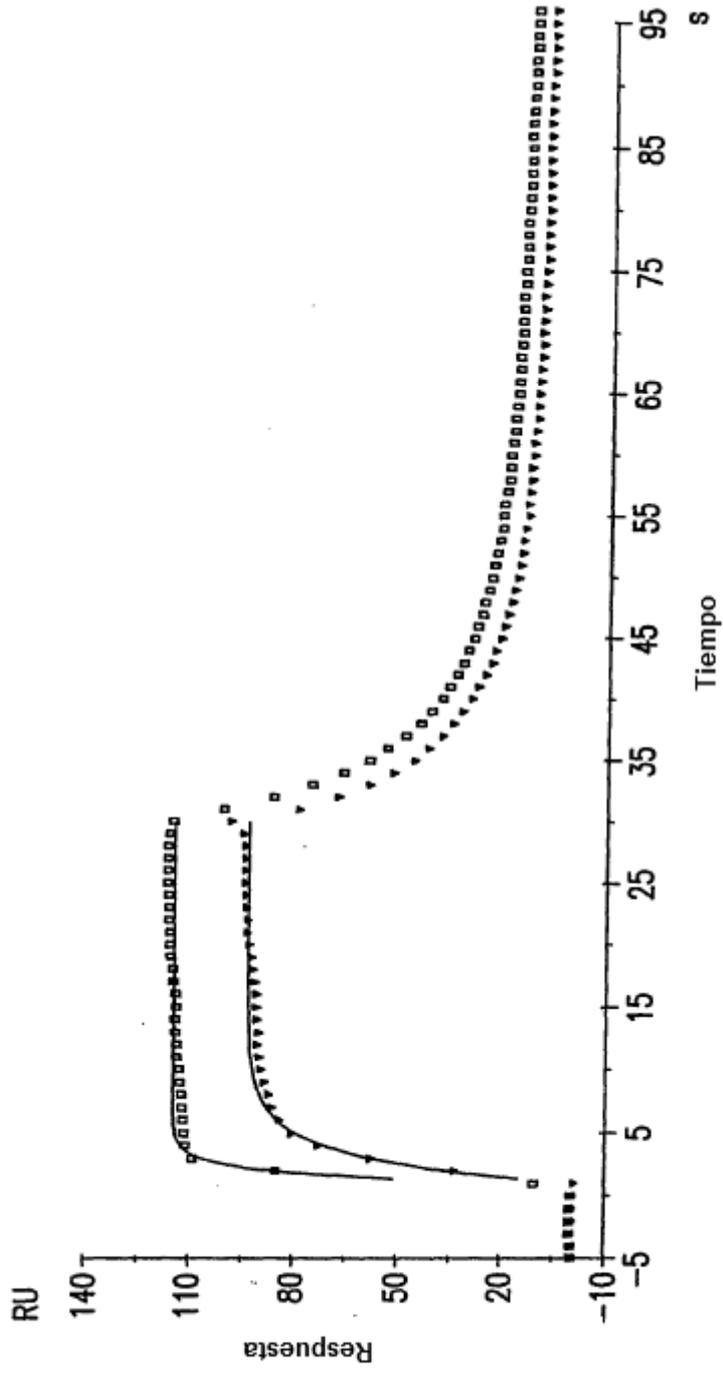


FIG.16G

0225mut19/FcR1IIa,avKd=100nM,koff=0.120 1/s

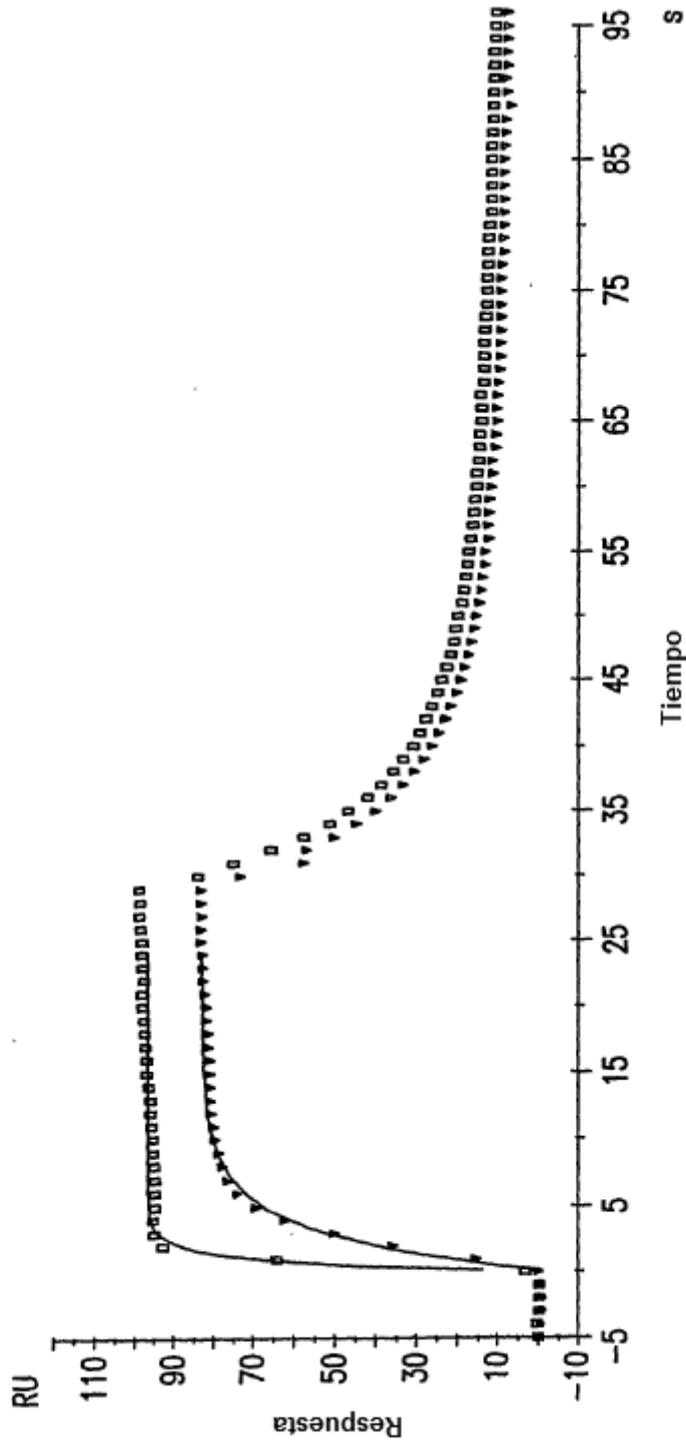


FIG. 16H

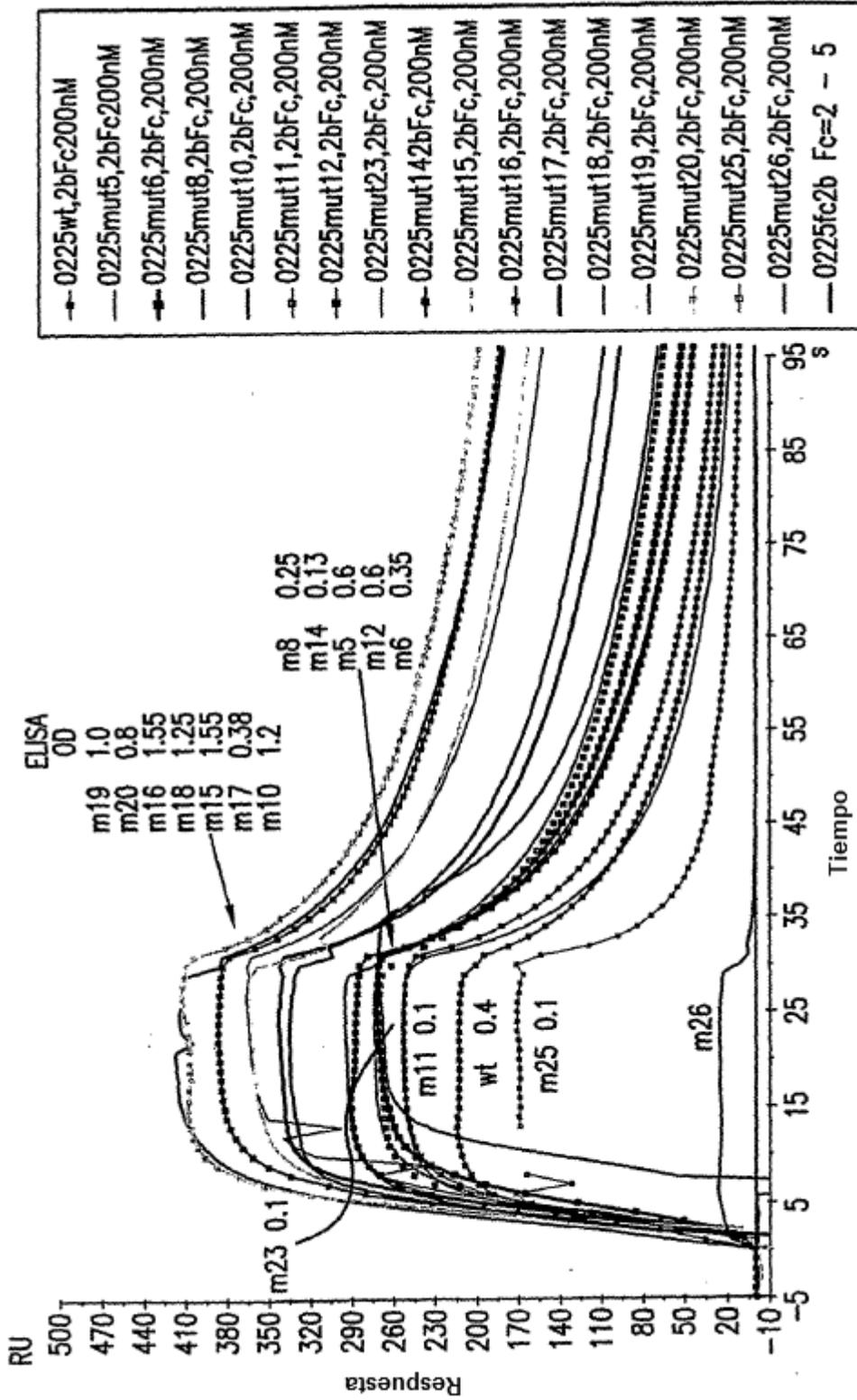


FIG.17

0.225wt/FcRIIb, $\alpha K_d=61.4\text{nM}$, $k_{\text{apagado}}=0.0847\text{ 1/s}$

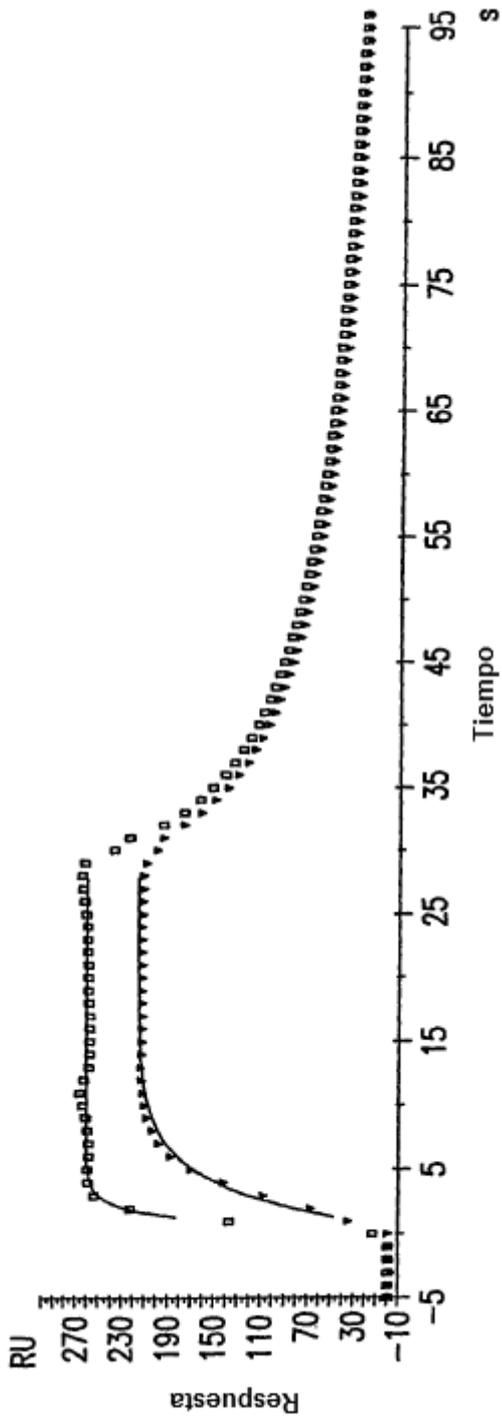


FIG.18A

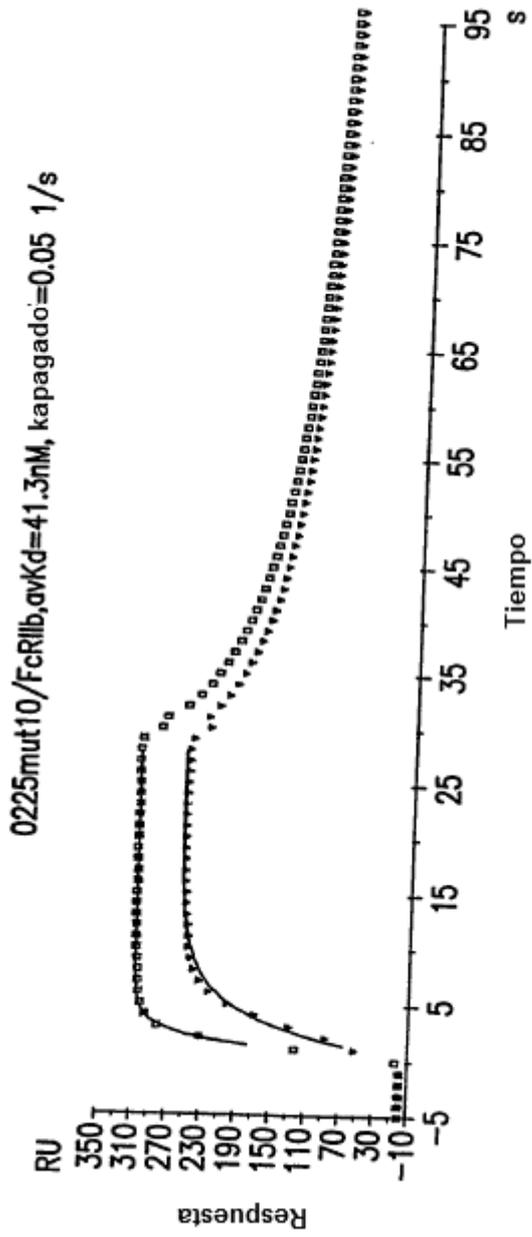


FIG.18B

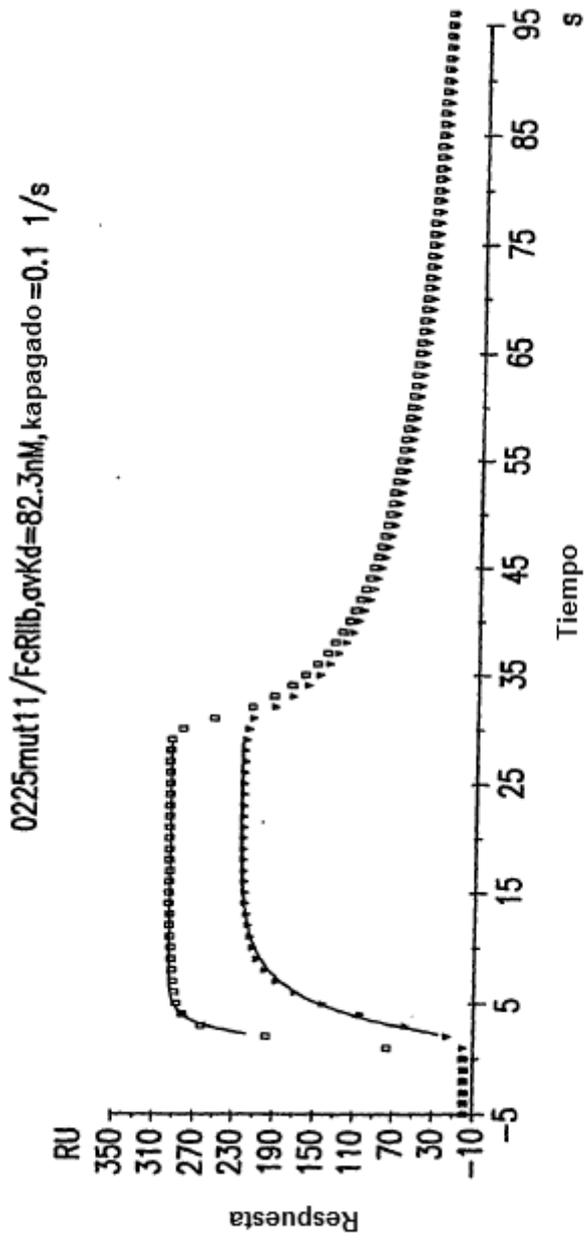


FIG.18C

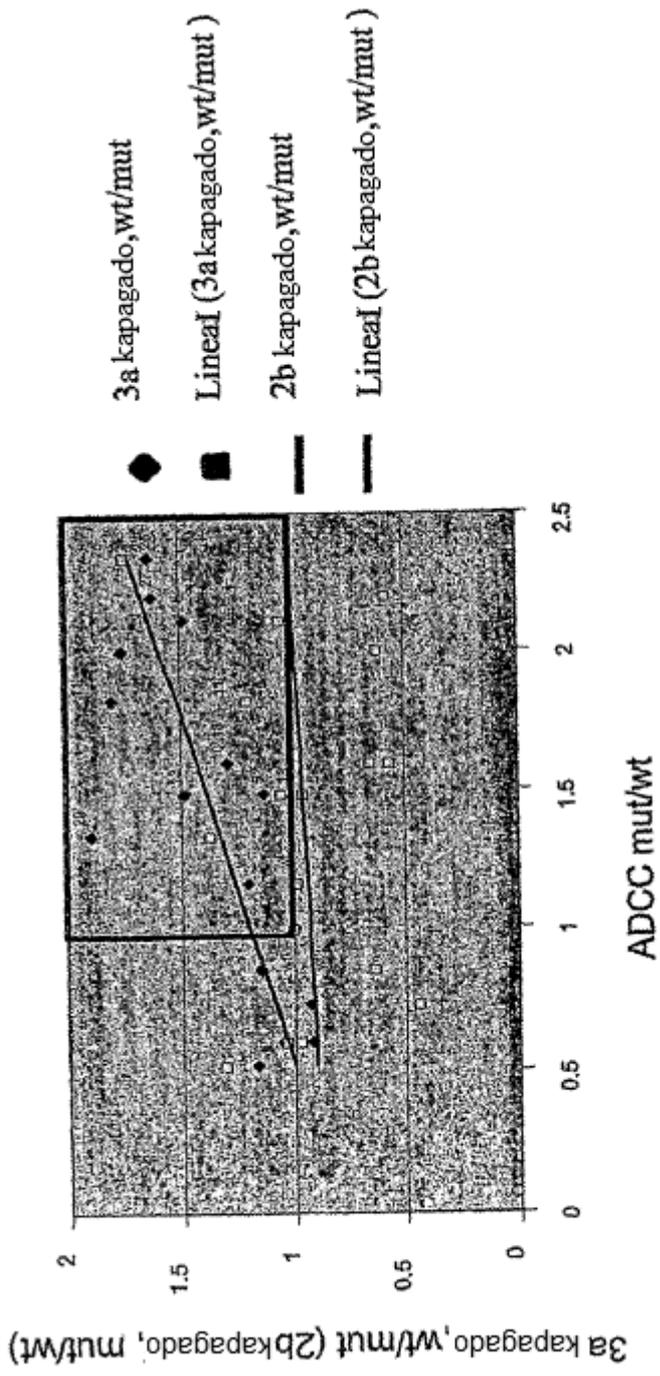


FIG. 19

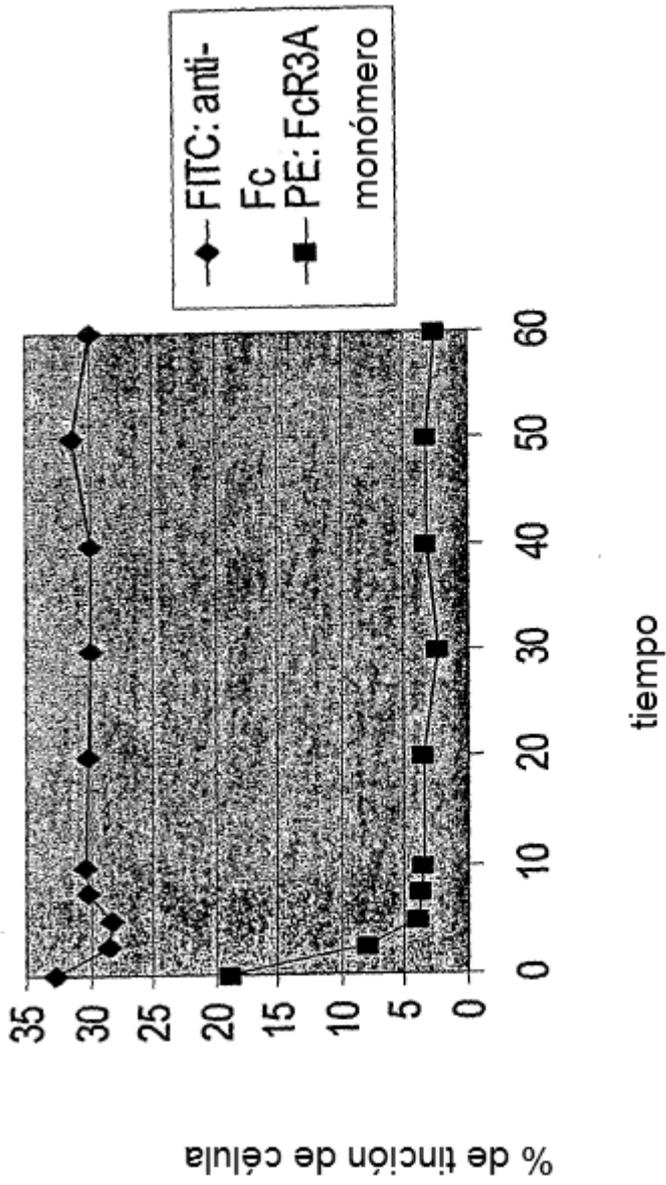


FIG. 20

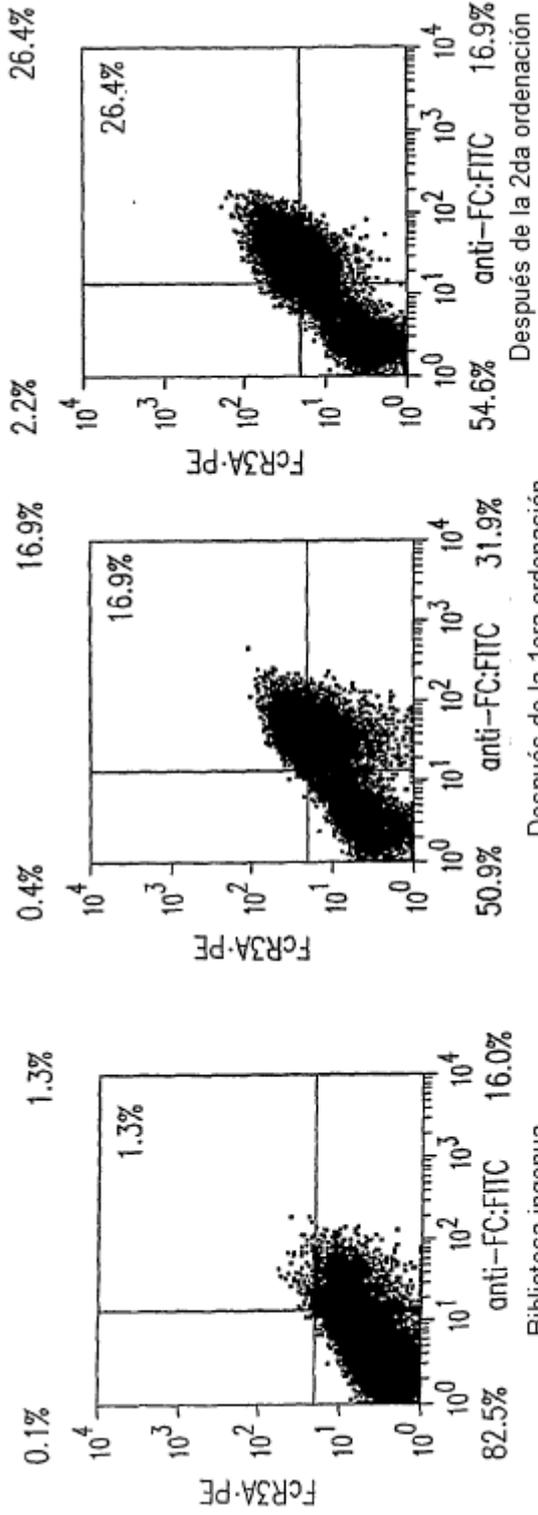


FIG. 21C

FIG. 21B

FIG. 21A

3aLAVI(V158) P051

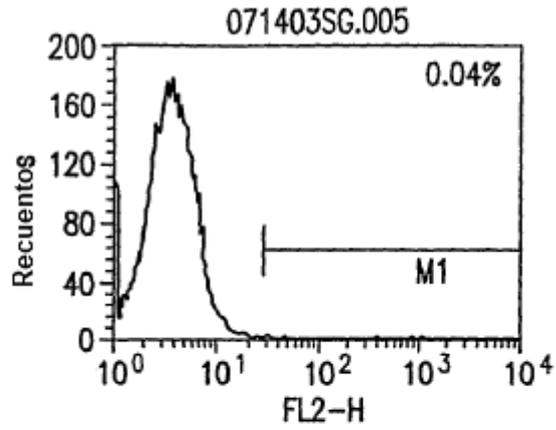


FIG. 22A-1

3aLAVI(V158) P051

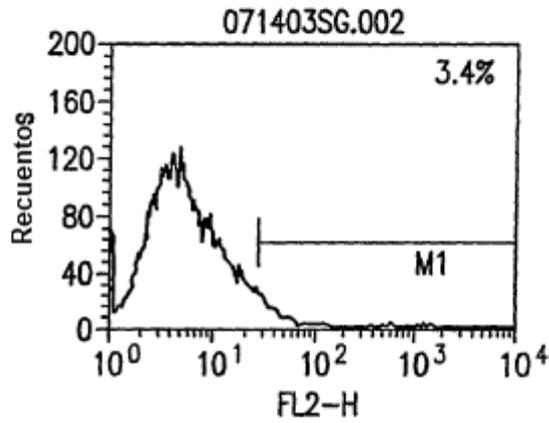


FIG. 22A-2

3aLAVI(V158) P051

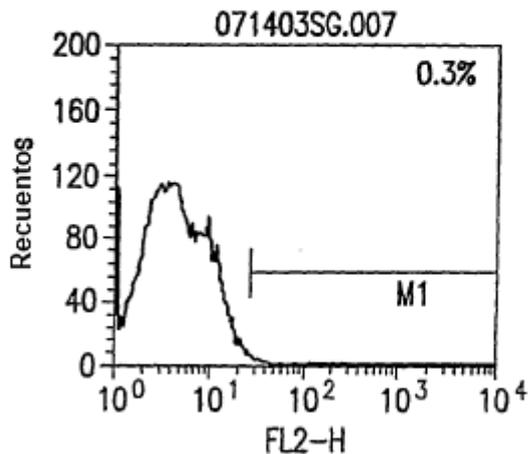


FIG. 22A-3

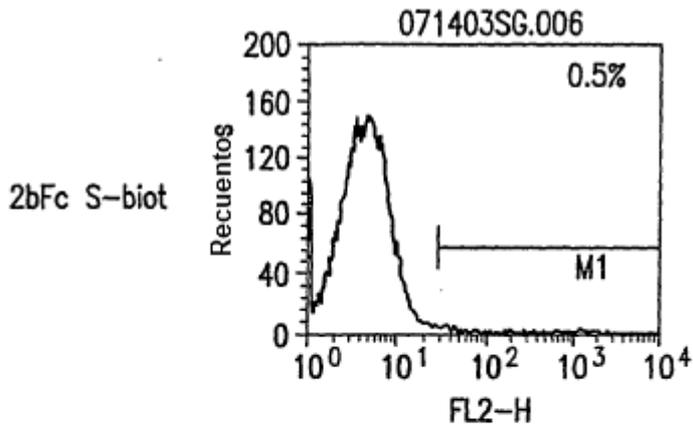


FIG. 22A-4

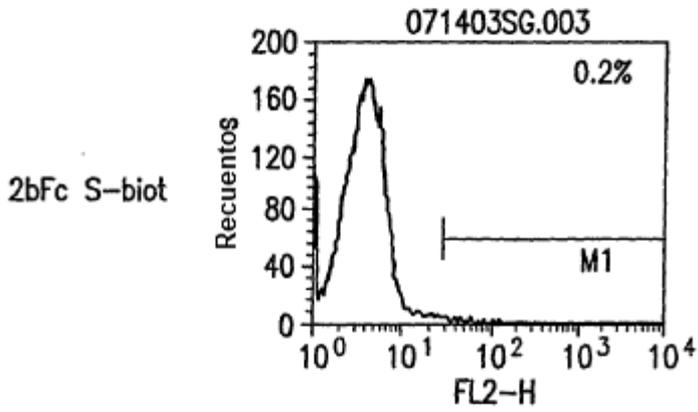


FIG. 22A-5

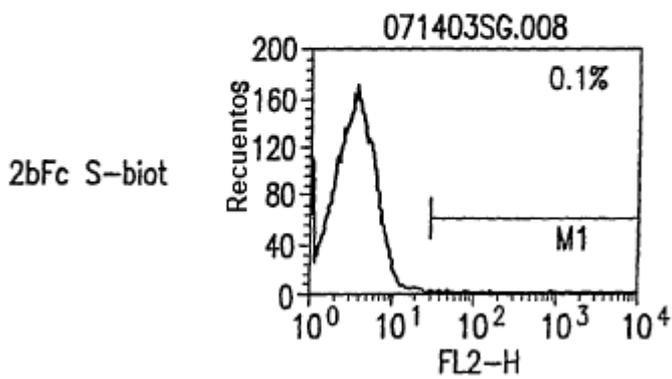


FIG. 22A-6

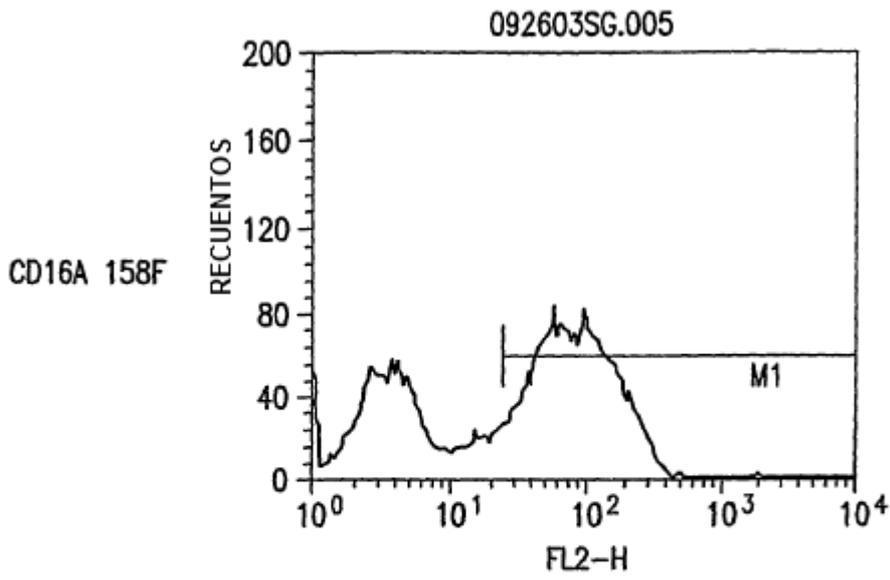


FIG. 22B-1

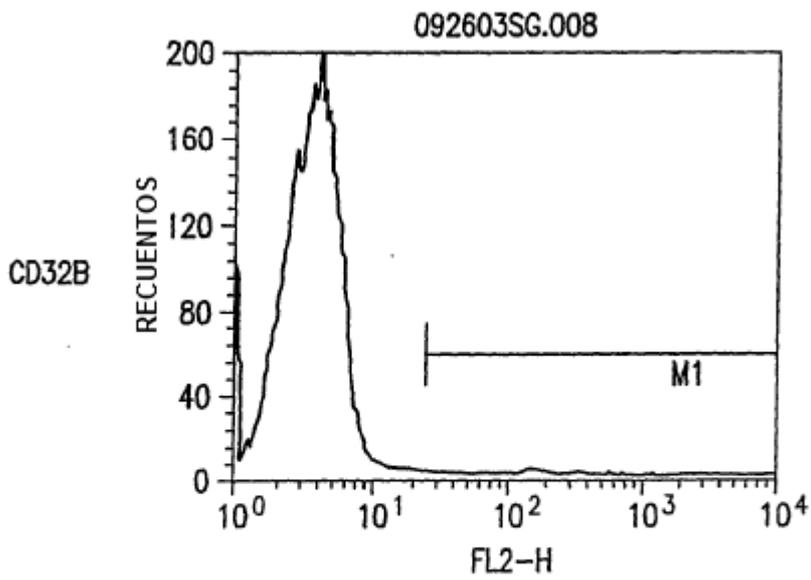


FIG. 22B-2

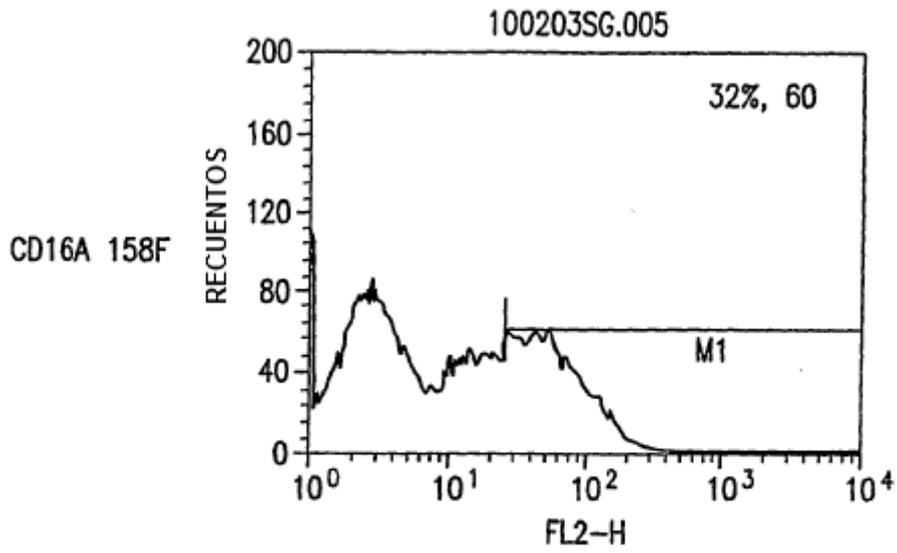


FIG. 22B-3

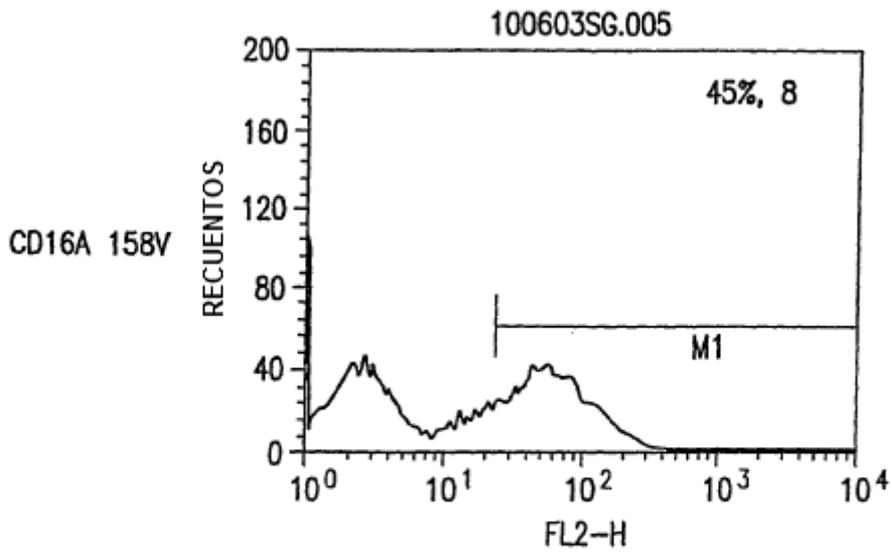


FIG. 22B-4

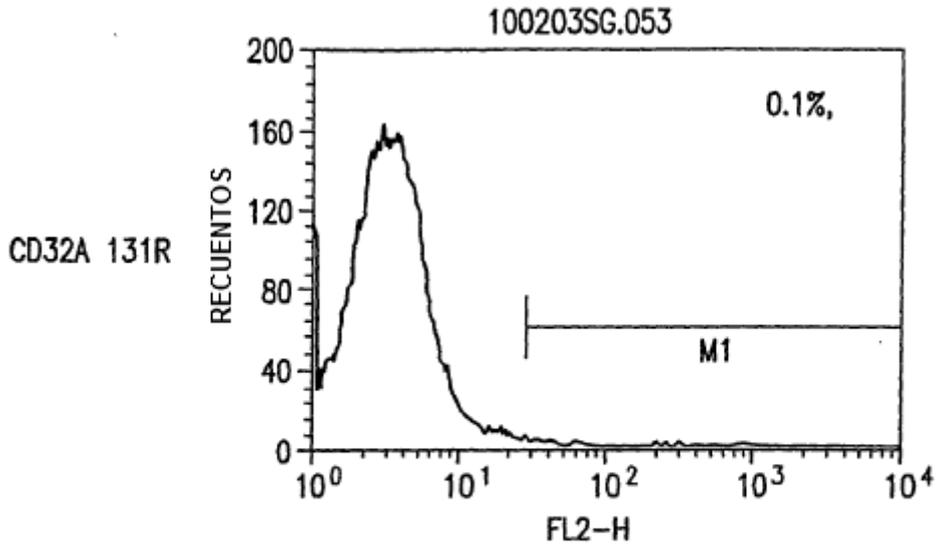


FIG. 22B-5

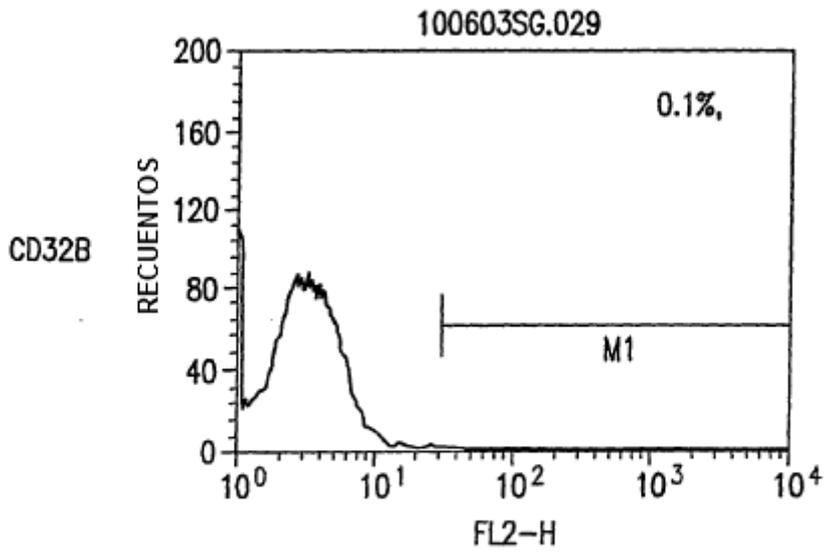


FIG. 22B-6

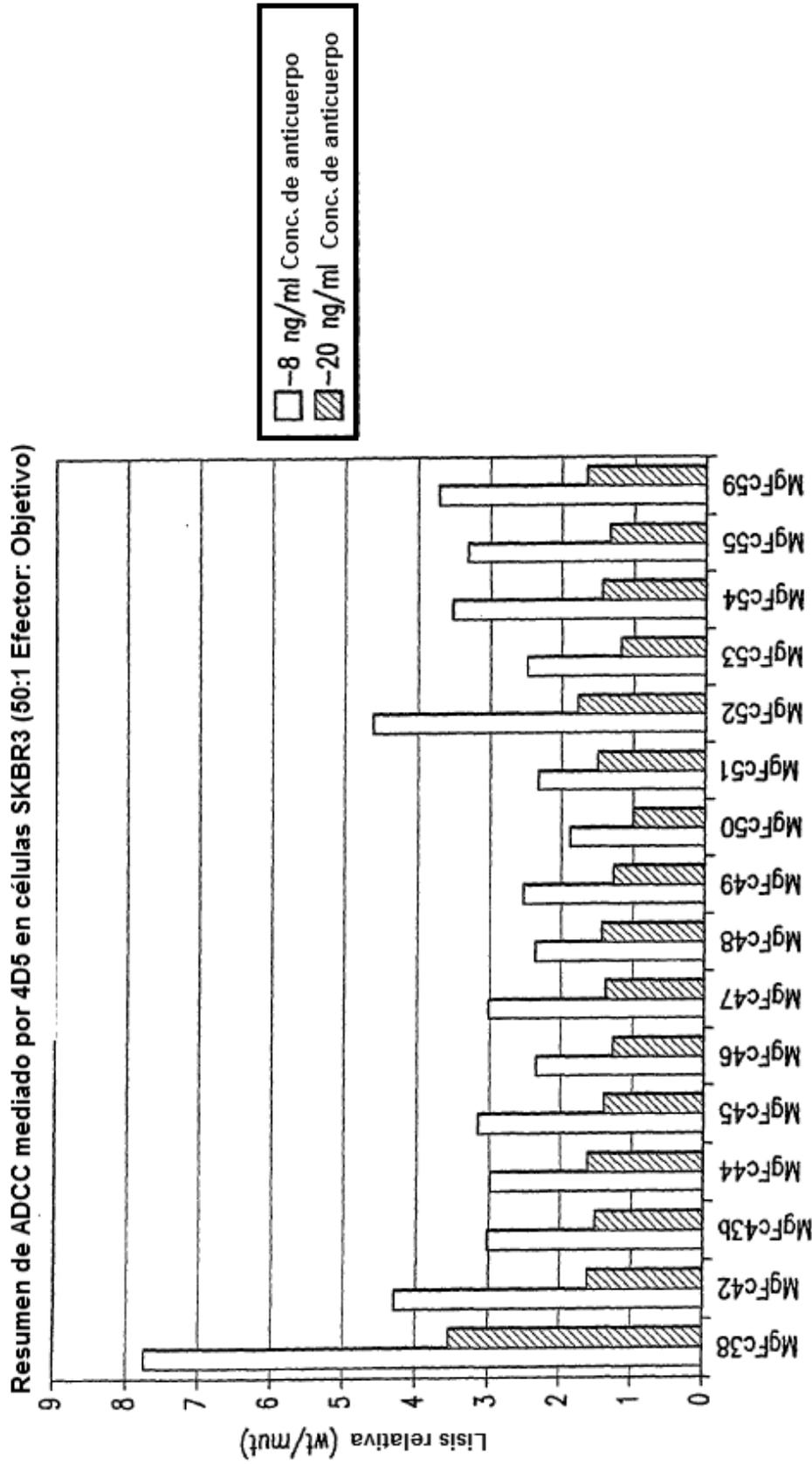


FIG. 23

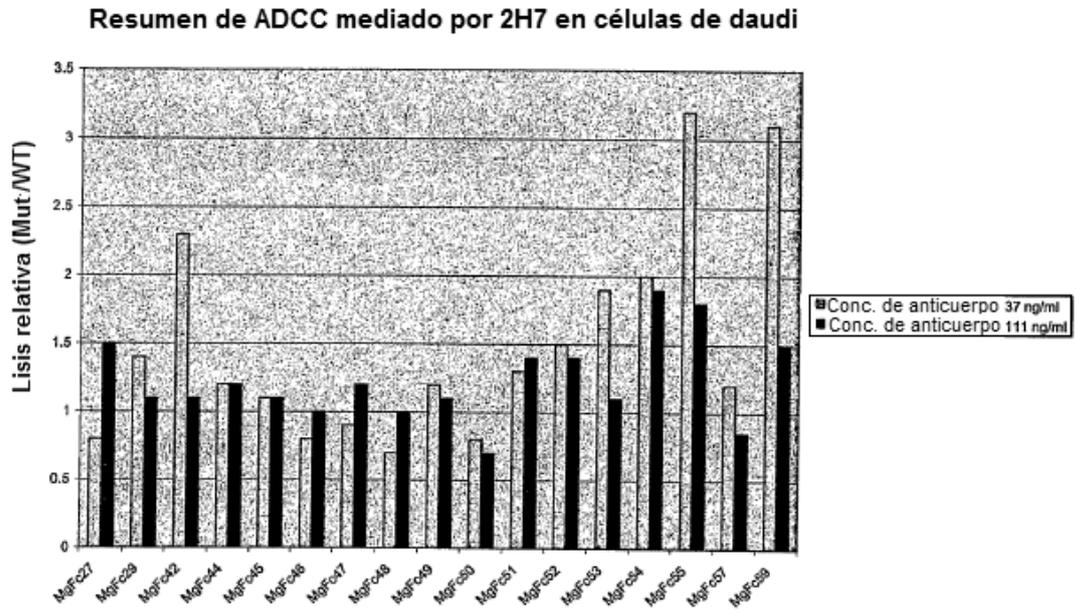


FIG. 24

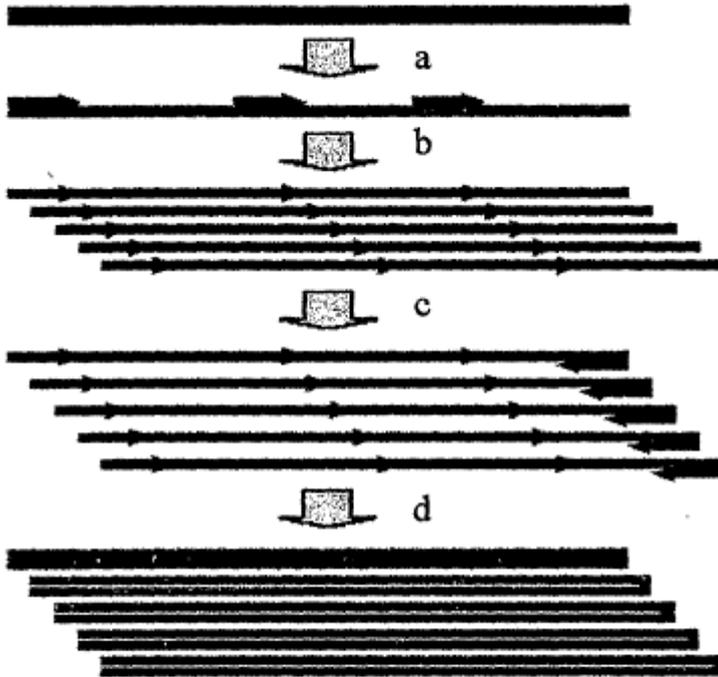


FIG. 25

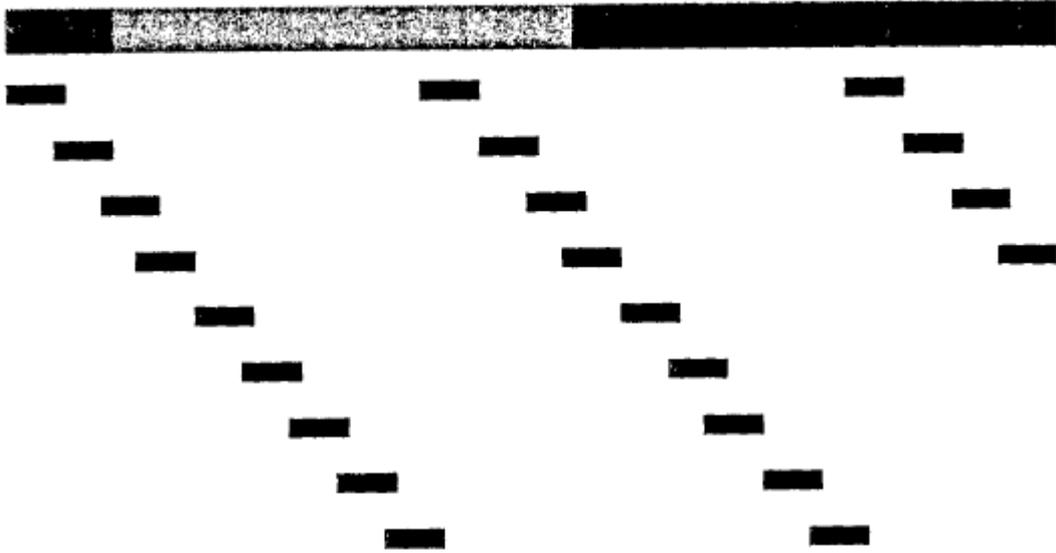


FIG. 26

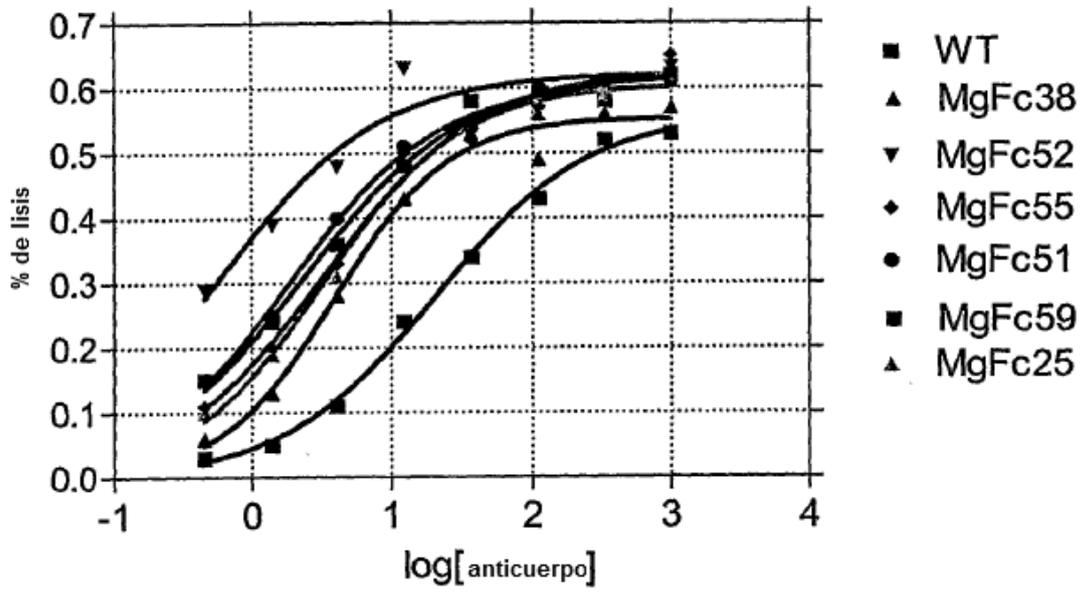


FIG. 27

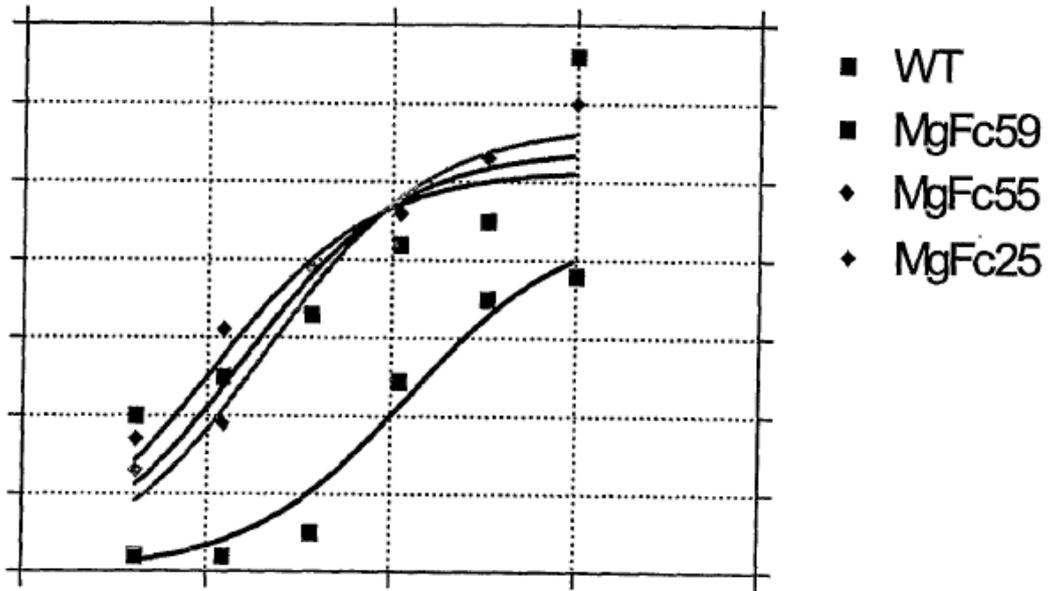


FIG. 28

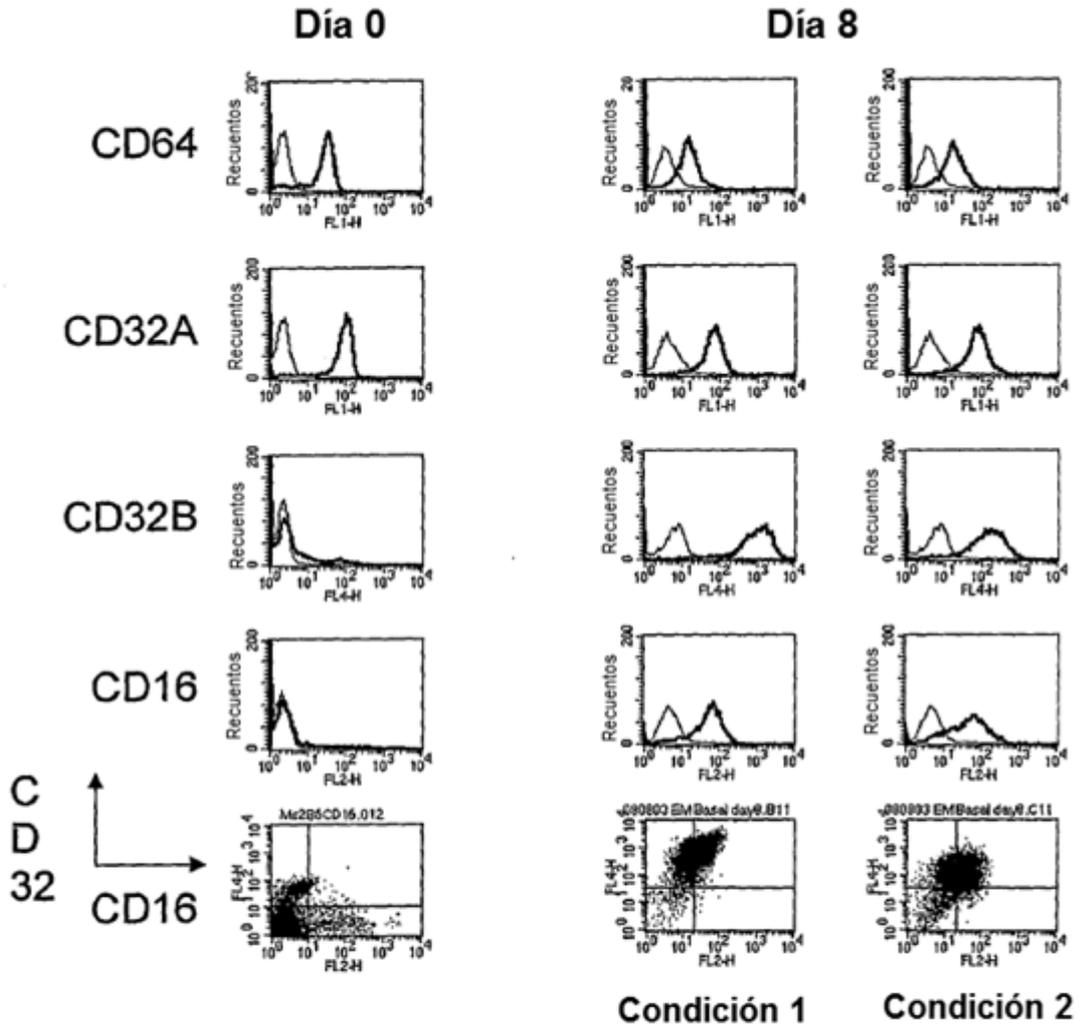


FIG. 29

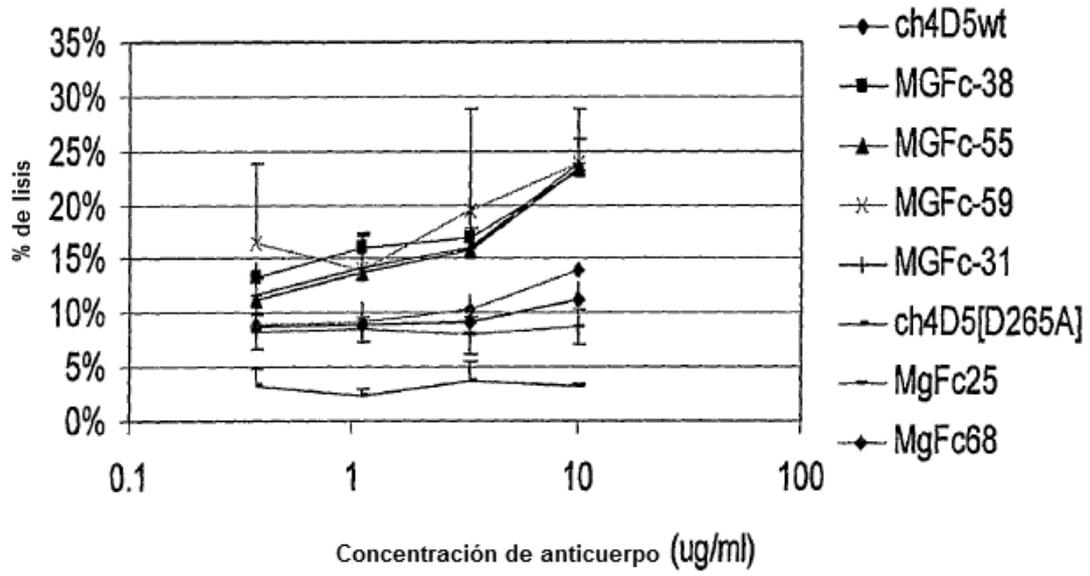


FIG. 30

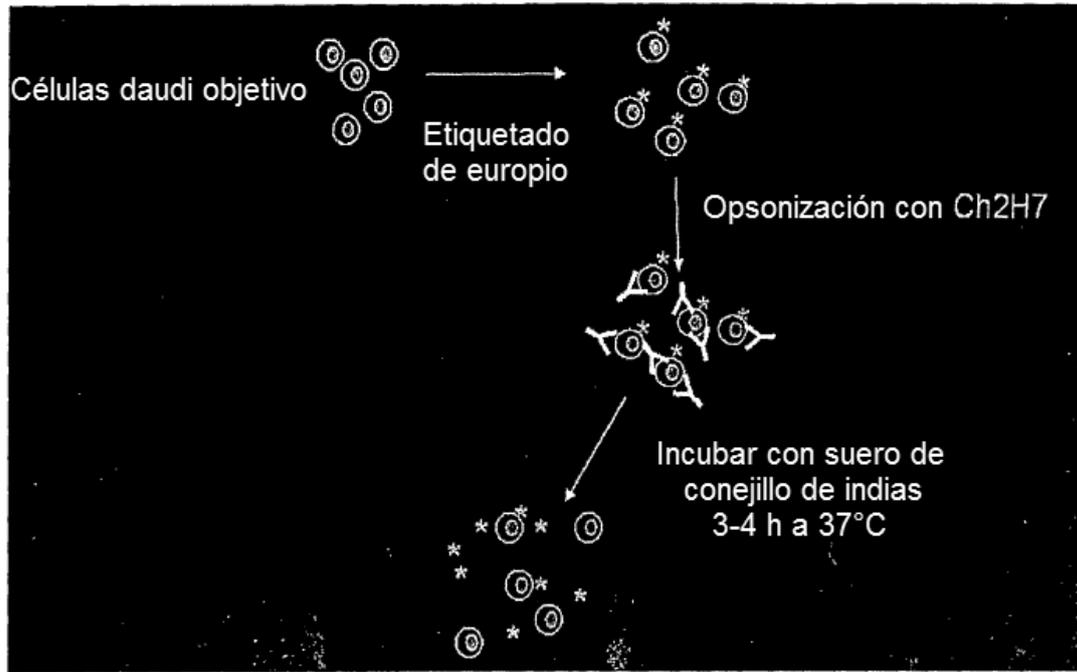


FIG. 31

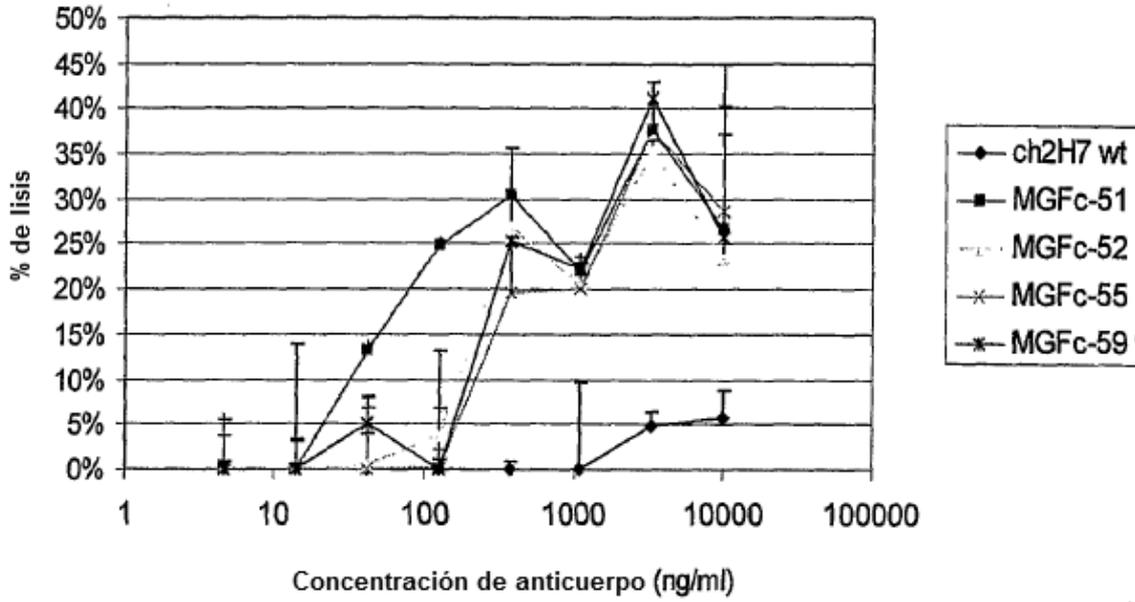


FIG. 32

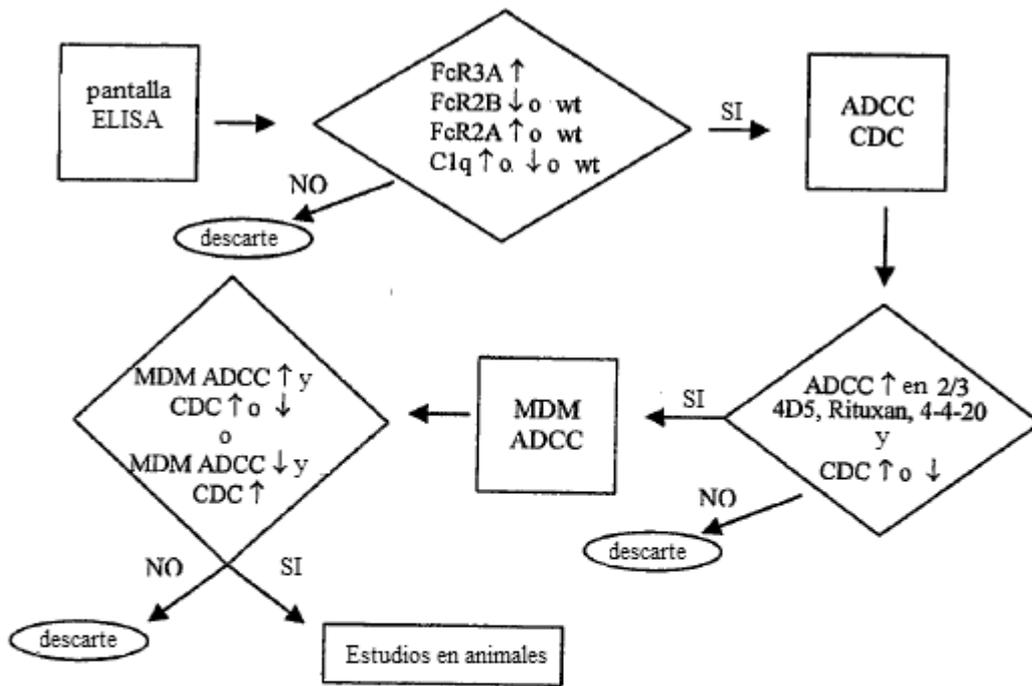


FIG. 33

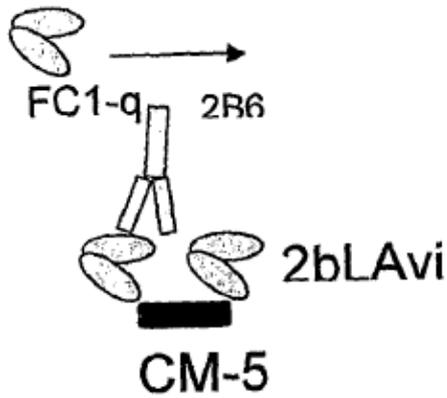


FIG. 34A

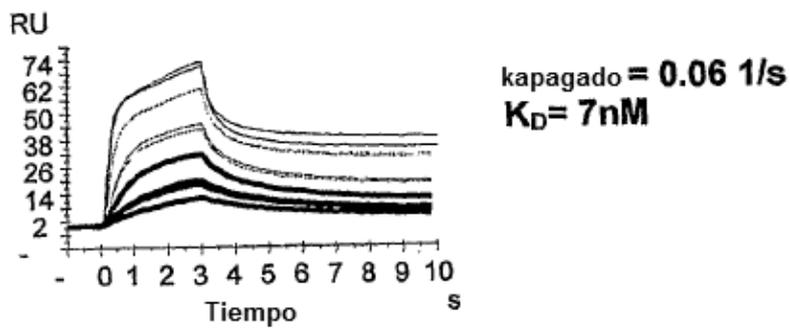
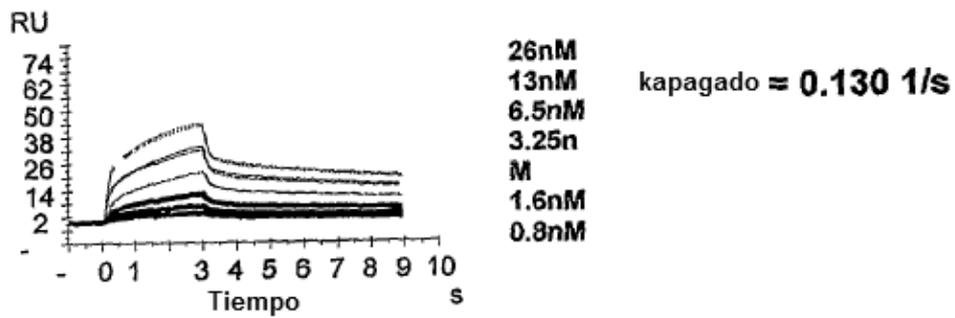


FIG. 34B

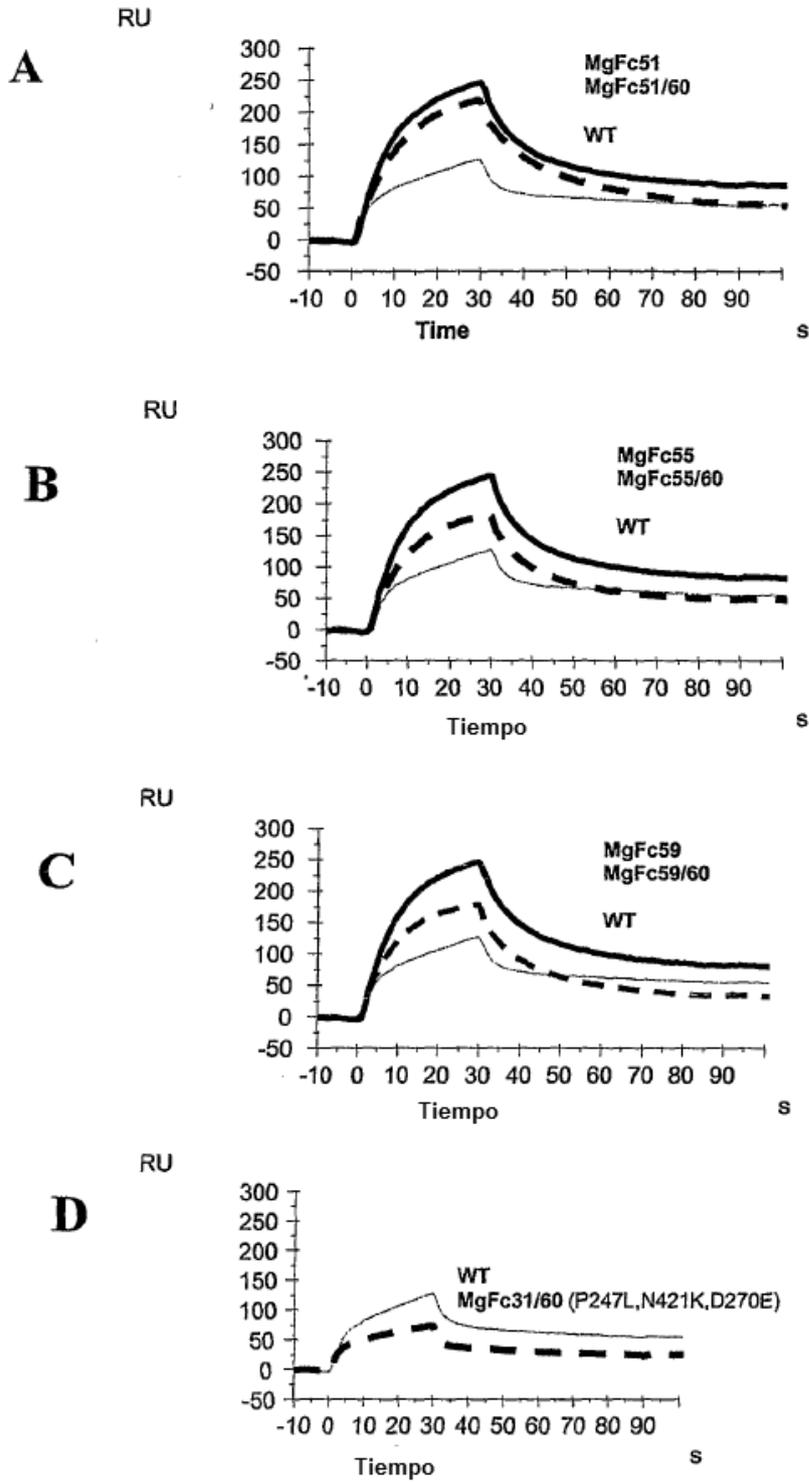
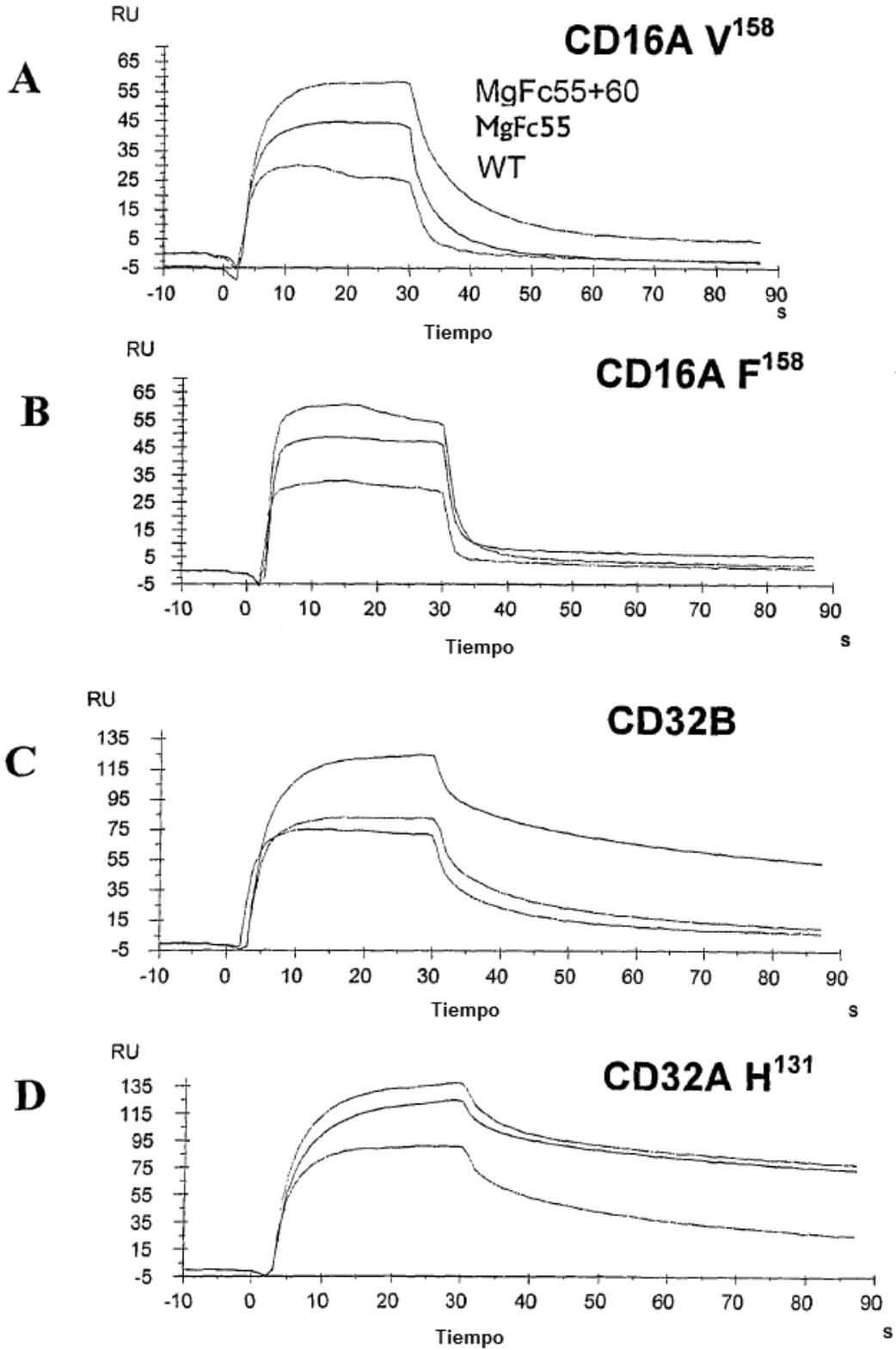


FIG. 35

FIG. 36



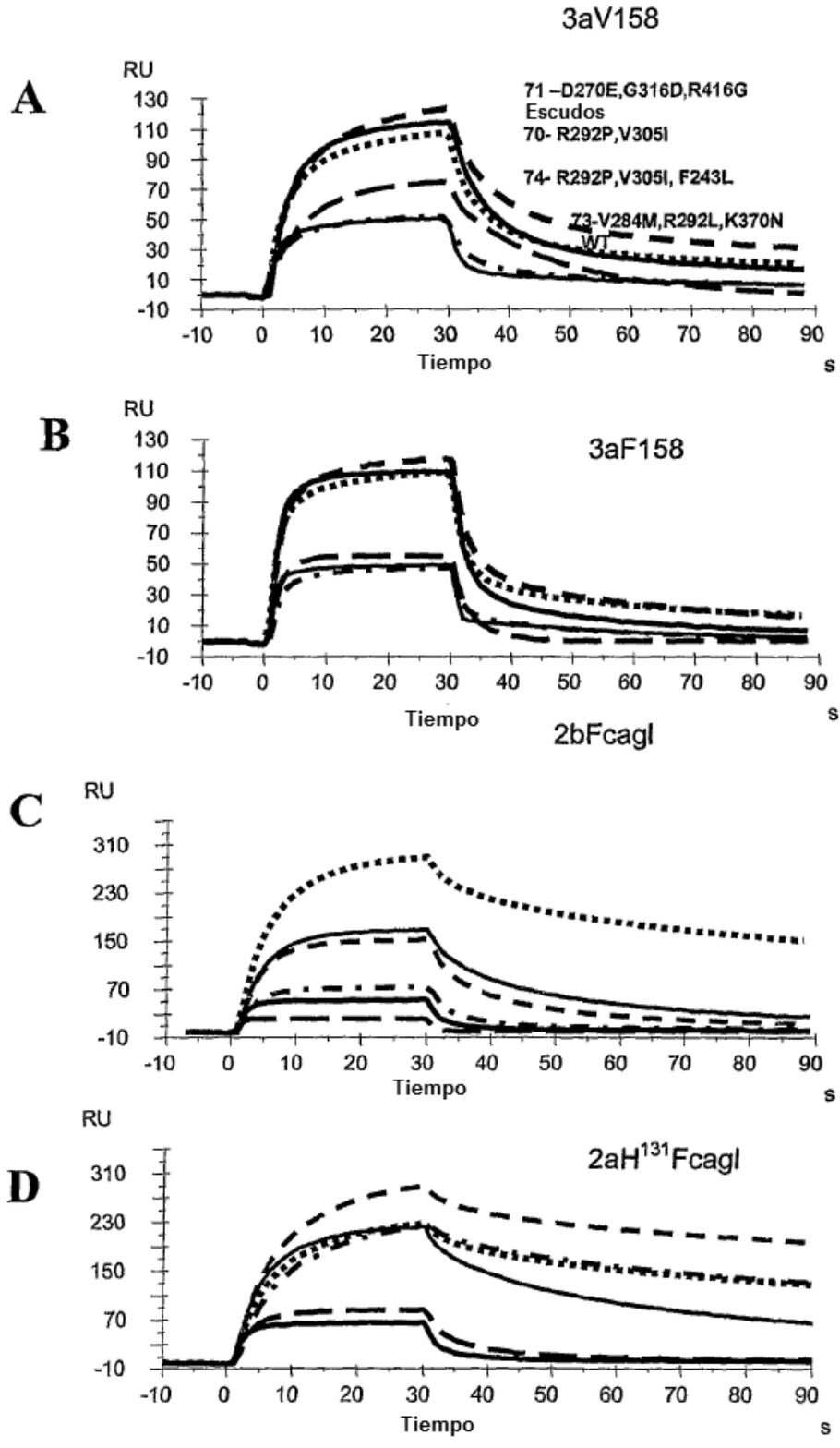


FIG. 37

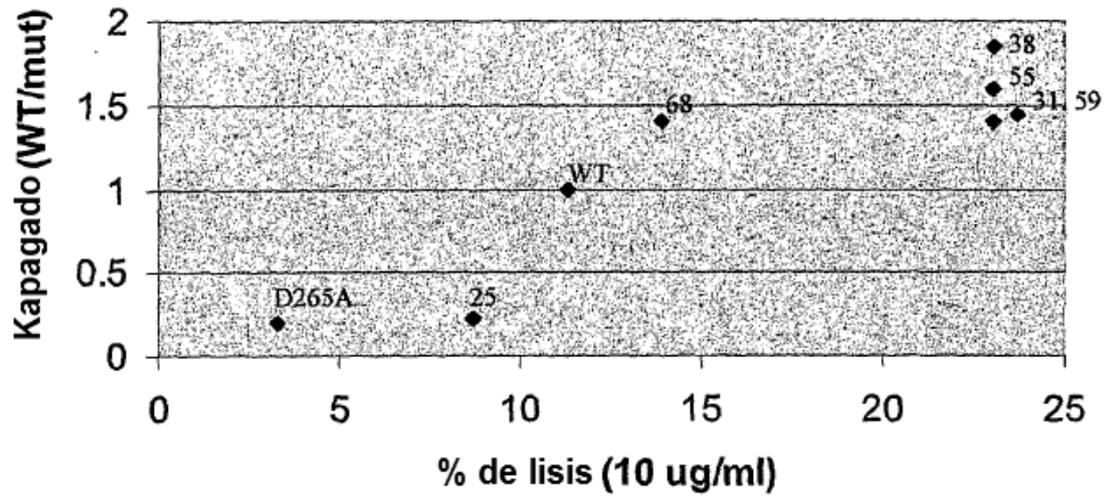


FIG. 38