

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 037**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2001 E 10010680 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2354149**

54 Título: **Moléculas con semividas prolongadas, composiciones y usos de las mismas**

30 Prioridad:

12.12.2000 US 254884 P

09.05.2001 US 289760 P

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

09.01.2018

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (50.0%)

One MedImmune Way

Gaithersburg, MD 20878, US y

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)

72 Inventor/es:

DALL'ACQUA, WILLIAM;

JOHNSON, LESLIE S. y

WARD, ELIZABETH SALLY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 649 037 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

Moléculas con semividas prolongadas, composiciones y usos de las mismas

5 1. Introducción

La presente invención se refiere a moléculas cuyas semividas *in vivo* aumentan por la modificación de un dominio constante de IgG, o dominio de unión a FcRn (receptor de Fc neonatal) del mismo. Específicamente, estas moléculas tienen modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad del dominio constante o fragmento del mismo por FcRn. El aumentar la semivida de IgG terapéuticas y de diagnóstico y otras moléculas bioactivas usando métodos de la invención tiene muchos beneficios que incluyen reducir la cantidad y/o frecuencia de dosificación de estas moléculas, por ejemplo, en vacunas, inmunoterapia pasiva y otros métodos terapéuticos y profilácticos. La invención se refiere además a proteínas de fusión que contienen todo o una porción (una porción de unión a FcRn) de un dominio constante de IgG que tiene una o más de estas modificaciones de aminoácidos y una proteína no de IgG o molécula no de proteína conjugada con un dominio constante de IgG modificada tal, donde la presencia del dominio constante de IgG modificada aumenta la semivida *in vivo* de la proteína no de IgG o molécula.

2. Antecedentes de la invención

20 El uso de inmunoglobulinas como agentes terapéuticos ha aumentado espectacularmente en los últimos años y se ha expandido a diferentes áreas de tratamientos médicos. Tales usos incluyen tratamiento de agammaglobulinemia e hipogammaglobulinemia como agentes inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades injerto contra huésped (GVH), el tratamiento de tumores malignos linfoides e inmunoterapias pasivas para el tratamiento de diversas enfermedades sistémicas e infecciosas. Por tanto, las inmunoglobulinas son útiles como herramientas de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, en procedimientos de diagnósticos de obtención de imágenes.

Un problema crítico en estas terapias es la persistencia de inmunoglobulinas en la circulación. La tasa de eliminación de inmunoglobulinas afecta directamente la cantidad y la frecuencia de dosificación de la inmunoglobulina. La elevada dosificación y frecuencia de dosificación pueden producir efectos adversos en el paciente y también aumentar los costes médicos.

La IgG es la clase de inmunoglobulina más predominante en los seres humanos y otros mamíferos y se utiliza en diversos tipos de inmunoterapias y procedimientos de diagnóstico. El mecanismo del catabolismo de IgG en la circulación ha sido aclarado mediante estudios relacionados con la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al feto/neonato a través de la placenta o el saco vitelino o a través de calostro (transferencia maternofetal de IgG mediante transcitosis) en roedores (Brambell, Lancet, ii:1087-1093, 1966; Rodewald, J. Cell Biol., 71:666-670, 1976; Morris et al., en: Antigen Absorption by the Gut, pp. 3-22, 1978, University Park Press, Baltimore; Jones et al., J. Clin. Invest., 51:2916-2927, 1972).

La participación de ciertos receptores en la transmisión maternofetal de IgG maternas fue sugerida por primera vez por el grupo de Brambell en su estudio sobre la absorción intestinal de anticuerpos maternos de leche ingerida en ratas recién nacidas (Halliday, Proc. R. Soc. B., 143:408-413, 1955; Halliday, Proc. R. Soc. B., 144:427-430, 1955; Halliday, Proc. R. Soc. B., 148:92-103, 1957; Morris, Proc. R. Soc. B., 148:84-91, 1957; Brambell et al., Proc. R. Soc. B., 149:1-11, 1958; Morris, Proc. R. Soc. B., 160:276-292, 1964). Brambell et al. sugirieron, basándose en la observación de que las IgG heterólogas interferían con la transmisión de un anticuerpo específico, que moléculas de IgG de diversas especies podrían tener estructuras suficientemente similares o secuencias que se unen a receptores comunes (Brambell et al, Proc. R. Soc. B., 149:1-11, 1958).

Un receptor de Fc de alta afinidad, FcRn, participa en este mecanismo de transferencia. El receptor de FcRn ha sido aislado de borde de cepillo epitelial duodenal de ratas lactantes (Rodewald et al., J. Cell Biol., 99:154s-164s, 1984; Simister et al., Eur. J. Immunol., 15:733-738, 1985) y el gen correspondiente ha sido clonado (Simister et al., Nature, 337:184, 1989 y Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., LIV, 571-580, 1989). Las posteriores clonaciones de genes que codifican FcRn de ratones (Ahouse et al., J. Immunol., 151:6076-6088, 1993) y seres humanos (Story et al., J. Exp. Med., 180:2377-2381, 1994) demuestran alta homología de estas secuencias con FcRn de rata, sugiriendo un mecanismo similar de transmisión maternofetal de IgG que implica FcRn en estas especies.

Mientras tanto, también se propuso un mecanismo para el catabolismo de IgG por el grupo de Brambell (Brambell et al., Nature, 203:1352-1355, 1964; Brambell, Lancet, ii:1087-1093, 1966). Propusieron que una proporción de moléculas de IgG en la circulación son unidas por ciertos receptores celulares (es decir, FcRn), que son saturables, por lo que las IgG se protegen de la degradación y con el tiempo se reciclan en la circulación; por otra parte, las IgG que no están unidas por los receptores son degradadas. El mecanismo propuesto estaba de acuerdo con el catabolismo de IgG observado en pacientes hipergammaglobulinémicos o hipogammaglobulinémicos. Además, basándose en sus estudios, además de otros (véase, por ejemplo, Spiegelberg et al., J. Exp. Med., 121:323-338, 1965; Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:78-85, 1969), Brambell también sugirió que los mecanismos implicados en la transferencia maternofetal de IgG y el catabolismo de IgG pueden ser tanto los mismos como, al

menos, estar muy estrechamente relacionados (Brambell, Lancet, ii: 1087-1093, 1966). De hecho, se informó después que una mutación en el fragmento Fc-bisagra causó cambios simultáneos en el catabolismo, transferencia materno-fetal, transcitosis neonatal y, particularmente, unión a FcRn (Ghetie et al., Immunology Today, 18(12):592-598, 1997).

Estas observaciones sugirieron que porciones del dominio constante de IgG controlan el metabolismo de IgG, que incluye la tasa de degradación de IgG en el suero mediante interacciones con FcRn. De hecho, la elevada afinidad de unión por FcRn aumentó la semivida en suero de la molécula (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994; Popov et al., Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Ghetie et al., Eur. J. Immunol., 26:690-696, 1996; Junghans et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:5512-5516, 1996; Israel et al., Immunol., 89:573-578, 1996).

Diversos experimentos de mutagénesis específica de sitio en la región Fc de IgG de ratón han conducido a una identificación de ciertos restos de aminoácidos críticos implicados en la interacción entre IgG y FcRn (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994; Medesan et al., Eur. J. Immunol., 26:2533, 1996; Medesan et al., J. Immunol., 158:2211-2217, 1997). Estos estudios y estudios de comparación de secuencias encontraron que la isoleucina en la posición 253, la histidina en la posición 310 y la histidina en la posición 435 (según la numeración de Kabat, Kabat et al., en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991, que se incorpora por este documento por referencia en su totalidad) están altamente conservadas en IgG humanas y de roedor, sugiriendo su importancia en la unión IgG-FcRn.

Además, diversas publicaciones describen métodos de obtención de moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican ya sea introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (documento WO 97/43316; patente de EE.UU. N.º 5.869.046; patente de EE.UU. N.º 5.747.035; documento WO 96/32478; documento WO 91/14438) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión por FcRn se preservan, pero las afinidades por otros receptores de Fc han sido enormemente reducidas (documento WO 99/43713) o fusionando con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (documento WO 00/09560; patente de EE.UU. N.º 4.703.039). Sin embargo, ninguna de estas publicaciones desvela mutantes específicos en el dominio constante de IgG que afecten la semivida.

Estudios de príon han demostrado que ciertas mutaciones del dominio constante reducen en realidad la unión a FcRn y así reducen la semivida de IgG *in vivo*. La publicación PCT WO 93/22332 (por Ward et al.) desvela diversas IgG de ratón recombinantes cuyas semividas *in vivo* se reducen por mutaciones entre aproximadamente el resto 253 y aproximadamente el resto 434. Particularmente, se encontró que sustituciones de isoleucina en la posición 253; histidina en la posición 310; glutamina en la posición 311; His en la posición 433; y asparagina en la posición 434 reducen la semivida de IgG.

La modulación de moléculas de IgG por sustitución, adición o delección de aminoácidos para aumentar o reducir la afinidad por FcRn también se desvela en el documento WO 98/23289; sin embargo, la publicación no enumera ningún mutante específico que presente o bien semividas más largas o bien más cortas *in vivo*.

En realidad, solo se ha identificado un mutante de IgG1 de ratón que en realidad presentó elevada semivida, la triple mutación Thr252 a Ala, Thr254 a Ser y Thr256 a Phe (documento WO 97/34631).

En vista de la importancia farmacéutica de aumentar las semividas *in vivos* de inmunoglobulinas y otras moléculas bioactivas, existe una necesidad de desarrollar IgG modificadas y fragmentos de unión a FcRn de las mismas (particularmente IgG humanas modificadas), que confieran semivida *in vivo* elevada a las inmunoglobulinas y otras moléculas bioactivas.

Ward et al. (Nature, 341, 1989, p544-546) describen las actividades de unión de un repertorio de dominios variables de Ig individuales secretados de *E. coli*.

3. Sumario de la invención

La presente invención se basa en la identificación de los inventores de varias mutaciones en el dominio constante de una molécula de IgG humana que aumentan la afinidad de la molécula de IgG por FcRn. En particular, los presentes inventores han cribado bibliotecas de dominios constantes de IgG1 humana con mutaciones de aminoácidos al azar introducidas en regiones particulares del dominio constante para elevada afinidad por FcRn. Tales mutaciones al azar se hicieron de los restos 251-256, 285-290 y 308-314, todos los cuales están en el dominio CH2, y 385-389 y 428-436, que están en el dominio CH3, de regiones bisagra-Fc de IgG1 humana (restos como se representa en la Figura 2 (SEQ ID NO:83 o restos análogos en regiones bisagra-Fc de otras moléculas de IgG como se ha determinado por alineamiento de secuencias). Como se usa en el presente documento, todos los restos del dominio constante de IgG están numerados según Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) y como se presenta en la Figura 2 (SEQ ID NO:83), e incluyen restos correspondientes en otros dominios constantes de IgG como se ha determinado por alineamiento de secuencias. La semivida *in vivo*, o persistencia en suero u otros tejidos de un sujeto, de anticuerpos, y otros agentes terapéuticos y otras moléculas bioactivas es un parámetro clínico importante que determina la cantidad y frecuencia

de administración de anticuerpo (o cualquier otra molécula farmacéutica). Por consiguiente, tales moléculas, que incluyen anticuerpos, con elevada semividada son de importancia farmacéutica significativa.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula modificada según la reivindicación 1.

Debe entenderse que todas las moléculas modificadas descritas en el presente documento comprenden un dominio CH3 humano en el que hay sustituciones de aminoácidos en las posiciones 433, 434 y 436, numeración según el índice EU de Kabat, en las que la sustitución en la posición 433 es una sustitución con una lisina, la sustitución en la posición 434 es una sustitución con una fenilalanina, y la sustitución en la posición 436 es una sustitución con una histidina. En lo sucesivo, referencias a modificación de uno o más restos de aminoácidos del dominio CH3 humano incluyen las sustituciones anteriormente mencionadas en las posiciones 433, 434 y 436.

Así, la presente invención se refiere a una molécula modificada (preferentemente una proteína, pero puede ser un agente no de proteína) que tiene una elevada semividada *in vivo* en virtud de la presencia de un dominio constante de IgG modificada, o porción de unión a FcRn de la misma (preferentemente, dominio Fc o bisagra-Fc) (preferentemente de una IgG humana) en la que el dominio constante de IgG, o fragmento del mismo, se modifica (por ejemplo, por sustitución, delección o inserción de aminoácidos) para aumentar la afinidad por el FcRn. En una realización particular, la presente invención se refiere a IgG modificadas, cuyas semividas *in vivo* se prolongan por la modificación de restos de aminoácidos identificados por estar implicados en la interacción del dominio bisagra-Fc con el receptor FcRn. Preferentemente, el dominio constante o fragmento del mismo tiene afinidad más alta por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4. Tales modificaciones pueden también alterar (es decir, aumentar o disminuir) la biodisponibilidad (por ejemplo, transporte a superficies de mucosa, u otros tejidos diana) de las moléculas. La invención también se refiere a otros tipos de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (es decir, inmunoglobulinas no IgG), proteínas no de inmunoglobulina y agentes no de proteína que están fusionados o conjugados con, o manipulados para contener, un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos tales.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona moléculas modificadas, particularmente, inmunoglobulinas cuyas semividas *in vivo* se prolongan por la presencia de un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferentemente, dominio Fc o bisagra-Fc), que tiene modificaciones de uno o más de restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436 que aumentan la afinidad de los dominios constantes o fragmentos de los mismos por FcRn. En ciertas realizaciones, estas modificaciones excluyen preferentemente los restos 252, 254 y 256, en particular cuando el dominio constante de IgG o fragmento del mismo, es murino. En realizaciones particulares, la modificación es en uno o más restos expuestos en la superficie, y la modificación es una sustitución con un resto de carga, polaridad o hidrofobia similar a la del resto que se sustituye.

En realizaciones preferidas, el dominio constante de IgG modificada se une con mayor afinidad a FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4. En una realización preferida, el dominio constante se modifica por sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436 que aumentan la afinidad del dominio constante por FcRn. En ciertas realizaciones, se excluyen las sustituciones del resto 252 con leucina, resto 254 con serina y/o resto 256 con fenilalanina, particularmente cuando el dominio constante o fragmento del mismo deriva de una IgG de ratón.

En realizaciones específicas, la invención proporciona inmunoglobulinas u otras moléculas bioactivas que contienen un dominio constante de IgG1 (preferentemente humana), que tienen modificaciones de aminoácidos en una o más de la posición 308, 309, 311, 312 y 314, más específicamente, que tienen sustituciones en una o más de las posiciones 308, 309, 311, 312 y 314 con treonina, prolina, serina, ácido aspártico y leucina, respectivamente. En otra realización, restos en una o más de las posiciones 308, 309 y 311 están sustituidos con isoleucina, prolina y ácido glutámico, respectivamente. En otra realización más, restos en una o más de las posiciones 308, 309, 311, 312 y 314 están sustituidos con treonina, prolina, serina, ácido aspártico y leucina, respectivamente. La invención se refiere además a combinaciones de estas sustituciones de aminoácidos.

Además, la invención proporciona inmunoglobulinas u otras moléculas bioactivas que contienen un dominio constante de IgG1 (preferentemente humana), que tiene modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 252, 254, 255 y 256, más específicamente, que tiene sustituciones en una o más de estas posiciones. En realizaciones específicas, el resto 251 está sustituido con leucina o arginina, el resto 252 está sustituido con tirosina, fenilalanina, serina, triptófano o treonina, el resto 254 está sustituido con treonina o serina, el resto 252 está sustituido con leucina, glicina, isoleucina o arginina, y/o el resto 256 está sustituido con serina, arginina, glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, asparagina o treonina. En una realización más específica, el resto 251 está sustituido con leucina, el resto 252 está sustituido con tirosina, el resto 254 está sustituido con treonina o serina, y/o el resto 255 está sustituido con arginina. En otra realización específica más, el resto 252 está sustituido con fenilalanina y/o el resto 256 está sustituido con ácido aspártico. En una realización preferida, el resto 251 está sustituido con leucina, el resto 252 está sustituido con tirosina, el resto 254 está sustituido con treonina o serina, y/o el resto 255 está sustituido con arginina. La invención se refiere además a cualquier combinación de estas sustituciones.

Además, la invención proporciona inmunoglobulinas u otras moléculas bioactivas que contienen un dominio constante de IgG1 (preferentemente, dominio Fc o bisagra-Fc) (preferentemente humana), que tiene modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 428, 433, 434 y 436, más específicamente, que tiene sustituciones en una o más de estas posiciones. En realizaciones específicas, el resto 428 está sustituido con metionina, treonina, leucina, fenilalanina.

Además, la invención proporciona inmunoglobulinas u otras moléculas bioactivas que contienen un dominio constante de IgG1, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferentemente, dominio Fc o bisagra-Fc) (preferentemente humana), que tiene modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 385, 386, 387 y 389, más específicamente, que tiene sustituciones en una o más de estas posiciones. En realizaciones específicas, el resto 385 está sustituido con arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina o alanina, el resto 386 está sustituido con treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina o metionina, el resto 387 está sustituido con arginina, histidina, serina, treonina, alanina o prolina, y/o el resto 389 está sustituido con prolina o serina. En realizaciones más específicas, los restos en una o más de las posiciones 385, 386, 387 y 389 están sustituidos con arginina, treonina, arginina y prolina, respectivamente. En otra realización específica más, restos en una o más de las posiciones 385, 386 y 389 están sustituidos con ácido aspártico, prolina y serina, respectivamente.

Las moléculas de la invención incluyen cualquier combinación de las sustituciones anteriormente descritas en uno o más de los restos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 y/o 436. En una realización preferida, la molécula de la invención contiene un dominio constante de IgG como se define en la reivindicación 1, que tiene una o más de las siguientes sustituciones: leucina en el resto 251, tirosina en el resto 252, treonina o serina en el resto 254, arginina en el resto 255, treonina en el resto 308, prolina en el resto 309, serina en el resto 311, ácido aspártico en el resto 312, leucina en el resto 314, arginina en el resto 385, treonina en el resto 386, arginina en el resto 387, prolina en el resto 389, metionina en el resto 428 y/o tirosina en el resto 434.

Incluidas dentro de la invención están composiciones farmacéuticas y usos para métodos de profilaxis y terapia usando inmunoglobulinas modificadas, proteínas y otras moléculas bioactivas de la invención que tienen semividas prolongadas. También están incluidos métodos de diagnóstico usando inmunoglobulinas modificadas, proteínas y otras moléculas bioactivas de la invención que tienen semividas prolongadas. En una realización específica, la invención proporciona un anticuerpo anti-virus respiratorio sincitial (VRS) útil para tratar o prevenir infección por VRS, tal como SYNAGIS[®] (véase la patente de EE.UU. N.º 5.824.307 y Johnson et al., J. Infectious Disease 176:1215-1224, 1997, y otros anticuerpos anti-VRS, que incluyen variantes de SYNAGIS[®] (véase la solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 09/724.396, presentada el 28 de noviembre de 2000, patente de Estados Unidos N.º 7.229.619, presentada el 28 de noviembre de 2000, patente de Estados Unidos N.º 2002/0177126, presentada el 28 de noviembre de 2001 y patente de Estados Unidos N.º 2005/0091584, presentada el 28 de noviembre de 2001, todas tituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment", todas de Young et al., particularmente las secuencias de dominios variables de la cadena pesada y ligera y CDR de anticuerpos anti-VRS desvelados en su interior), que tienen una o más modificaciones de aminoácidos en el dominio constante que aumentan la afinidad del anticuerpo por FcRn y que tienen una elevada semivida *in vivo* (véase, por tanto, la Sección 5.1, abajo).

3.1 Definiciones

El término "región Fc de IgG", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de una molécula de IgG que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido por digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc consiste en la mitad del extremo C de las dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que son unidas por enlaces disulfuro. No tiene actividad de unión a antígeno, pero contiene el resto de hidrato de carbono y los sitios de unión para el complemento y receptores de Fc, que incluyen el receptor FcRn (véase más adelante). El fragmento Fc contiene el segundo dominio constante CH2 completo (restos 231-340 de IgG1 humana, según el sistema de numeración de Kabat) (por ejemplo, SEQ ID NO:80) y el tercer dominio constante CH3 (restos 341-447) (por ejemplo, SEQ ID NO:81).

El término "región bisagra-Fc de IgG" o "fragmento de bisagra-Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de una molécula de IgG que consiste en la región Fc (restos 231-447) y una región bisagra (restos 216-230; por ejemplo, SEQ ID NO:82) que se extiende desde el extremo N de la región Fc. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra-Fc de IgG1 humana es SEQ ID NO:83.

El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CHL de la cadena ligera.

El término "receptor FcRn" o "FcRn", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor de Fc ("n" indica neonatal) que se sabe que participa en la transferencia de IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primate, o saco vitelino (conejos) y a un neonato a partir del calostro a través del intestino delgado.

También se sabe que FcRn participa en el mantenimiento de niveles constantes de IgG en suero uniendo las moléculas de IgG y recirculándose en el suero. La unión de FcRn a moléculas de IgG es estrictamente dependiente del pH con unión óptima a pH 6,0. FcRn comprende un heterodímero de dos polipéptidos, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 50 kD y 15 kD, respectivamente. Los dominios extracelulares del polipéptido de 50 kD están relacionados con las cadenas α de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el polipéptido de 15 kD se mostró que era la β_2 -microglobulina no polimórfica (β_2 -m). Además de placenta e intestino neonatal, el FcRn también se expresa en diversos tejidos a través de especies, además de diversos tipos de líneas celulares endoteliales. También se expresa en endotelio vascular adulto humano, vasculatura muscular y sinusoides hepáticos y se sugiere que las células endoteliales pueden ser los principales responsables del mantenimiento de niveles de IgG en suero en seres humanos y ratones. Las secuencias de aminoácidos de FcRn humano y FcRn murino se indican por SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO:85, respectivamente. También están incluidos homólogos de estas secuencias que tienen actividad de FcRn.

El término "semivida *in vivo*", como se usa en el presente documento, se refiere a una semivida biológica de un tipo particular de molécula de IgG o sus fragmentos que contienen sitios de unión a FcRn en la circulación de un animal dado y se representa por un tiempo requerido para que la mitad de la cantidad administrada en el animal sea eliminada de la circulación y/u otros tejidos en el animal. Cuando se construye una curva de eliminación de una IgG dada en función del tiempo, la curva es normalmente bifásica con una fase α rápida que representa un equilibrio de las moléculas de IgG inyectadas entre el espacio intra- y extra-vascular y que está, en parte, determinado por el tamaño de moléculas, y una fase β más larga que representa el catabolismo de las moléculas de IgG en el espacio intravascular. El término "semivida *in vivo*" se corresponde prácticamente con la semivida de las moléculas de IgG en la fase β .

Un anticuerpo o proteína de fusión "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido de la que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El vocabulario "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo o una proteína de fusión en las que el anticuerpo o la proteína de fusión se separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente. Así, un anticuerpo o una proteína de fusión que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo o proteína de fusión que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, o 5 % (por peso seco) de proteína contaminante. Cuando el anticuerpo o la proteína de fusión se produce recombinantemente, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 %, o el 5 % del volumen de la preparación de proteína.

Cuando el anticuerpo o la proteína de fusión se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros productos químicos que participan en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones del anticuerpo o la proteína de fusión tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (por peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de interés. En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos están aislados o purificados. En otra realización preferida de la invención, las proteínas de fusión están aisladas o purificadas.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se separa de otras moléculas de ácidos nucleicos que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una molécula de ácido nucleico "aislada" no incluye moléculas de ADNc dentro de una biblioteca de ADNc. En una realización preferida de la invención, moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos están aisladas o purificadas. En otra realización preferida de la invención, moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión están aisladas o purificadas.

El término "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se refiere a la célula particular objeto transfectada con una molécula de ácido nucleico o infectada con fagémido o bacteriófago y la progenie o posible progenie de una célula tal. La progenie de una célula tal puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula hospedadora.

Los nombres de aminoácidos citados en el presente documento se abrevian o bien con símbolos de tres letras o de una letra.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Entonces se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en

la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones de solapamiento idénticas/número total de posiciones x 100 %). En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Un algoritmo tal se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos con BLAST con el conjunto de parámetros de programa de nucleótidos de NBLAST, por ejemplo, para puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas con BLAST con el conjunto de parámetro del programa XBLAST, por ejemplo, para puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Si se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Un algoritmo tal se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Si se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de restos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, normalmente solo se cuentan correspondencias exactas.

4. Descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la estructura de la región bisagra-Fc de IgG que indica las localizaciones de los restos identificados por estar implicados en la interacción con el receptor FcRn (Ghetie et al., Immunology Today, 18(12):592-598, 1997).

La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la región bisagra-Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:83) que contiene una región bisagra (SEQ ID NO:82), dominio CH2 (SEQ ID NO:80) y dominio CH3 (SEQ ID NO:81). Las FIG. 3 (A y B) muestran las secuencias de aminoácidos de (A) FcRn humano (SEQ ID NO:84) y (B) FcRn de ratón (SEQ ID NO:85), respectivamente.

La FIG. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la región bisagra-Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO:83), en la que restos no mutados que son mutados por sustituciones de aminoácidos se indican en negrita subrayados.

La FIG. 5 muestra un diagrama esquemático del proceso de inmunopurificación para la biblioteca de bisagra-Fc modificada presentada en fago.

La FIG. 6 muestra un resumen de la aparición de restos mutantes seleccionados en las posiciones de variante en las bibliotecas cribadas.

FIG. 7 (A-D). (A) muestra la unión de FcRn murino a IgG1 inmovilizada que tiene sustituciones M252Y/S254T/T256E. Se inyectó FcRn murino a 10 concentraciones diferentes que oscilaban de 1 nM a 556 nM sobre una superficie sobre la que se habían acoplado 4000 unidades de resonancia (UR) de IgG1. Después de que se alcanza el equilibrio, se eluyó proteína unida residual con un pulso de PBS, pH 7,4. (B) muestra la unión de FcRn humano a IgG1 inmovilizada/M252Y/S254T/T256E. Se inyectó FcRn murino a 8 concentraciones diferentes que oscilaban de 71 nM a 2,86 μ M sobre una superficie sobre la que se habían acoplado 1000 UR de IgG1. Después de que se alcanza el equilibrio, se eluyó proteína unida residual con un pulso de PBS, pH 7,4. (C) y (D) muestran análisis de Scatchard de los datos en (A) y (B), respectivamente, después de la corrección para unión no específica. R_{eq} es la respuesta en equilibrio corregida a una concentración dada C. Las representaciones son lineales con coeficientes de correlación de 0,97 y 0,998, respectivamente. K_d aparentes son 24 nM y 225 nM, respectivamente.

Las FIG. 8 (A-H). (A)-(D) muestran los resultados de análisis BIAcore de la unión de FcRn murino a pH 6,0 y pH 7,4 a (A) IgG1 humana no mutada, (B) M252Y/S254T/T256E, (C) H433K/N434F/Y436H, y (D) G385D/Q386P/N389S, respectivamente, después de la corrección para unión no específica. Se inyectó FcRn murino a una concentración de 1,1 μ M sobre una superficie sobre la que se habían acoplado 1000 UR de IgG1 no mutada, 1000 UR de M252Y/S254T/T256E, 955 UR de H433K/N434F/Y436H y 939 UR de G385D/Q386P/N389S. (E)-(H) muestran los resultados de análisis BIAcore de la unión de FcRn humano a pH 6,0 y pH 7,4 a (E) IgG1 humana no mutada, (F) M252Y/S254T/T256E, (G) H433K/N434F/Y436H, y (H) G385D/Q386P/N389S, respectivamente, después de corrección para unión no específica. Se inyectó FcRn humano a una concentración de 1,4 μ M sobre una superficie sobre la que se habían acoplado 1000 UR de IgG1 no mutada, 1000 UR de M252Y/S254T/T256E, 955 UR de H433K/N434F/Y436H y 939 UR de G385D/Q386P/N389S.

La FIG. 9 muestra el modelo de llenado del espacio de la superficie del fragmento Fc de una IgG1 humana basándose en la estructura de IgG1 humana de Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20:2361-2370. Los restos están codificados por color según el aumento de libre energía de estabilización del complejo Fc-FcRn: rojo, se encontró que las sustituciones en estas posiciones aumentaban la afinidad un factor de al menos 2,5 veces en la interacción Fc/FcRn humano y de al menos 5 veces en la interacción de Fc/FcRn de ratón; azul, se encontró que las sustituciones en aquellas posiciones aumentaban la afinidad un factor de menos de 2 veces en tanto la interacción Fc-FcRn humano como Fc-FcRn de ratón. La figura se dibujó usando Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997, Electrophoresis 18:2714-2723).

La FIG. 10 muestra los cambios en la concentración en suero ([Mab] ng/ml) con el tiempo (en días) de anticuerpo que tiene un dominio constante no mutado (SYNAGIS[®]) (cuadrados blancos), o dominios constantes con las siguientes mutaciones: M252Y/S254T/T256E (círculos blancos), G385D/Q386P/N389S (cuadrados rellanos) y H433K/N434F/Y436H (círculos rellenos). La concentración de anticuerpo se determinó usando ELISA anti-IgG humana.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a moléculas modificadas, particularmente proteínas, más particularmente inmunoglobulinas, que tienen una elevada semivida *in vivo* y comprenden un dominio constante de IgG, que se unen a un FcRn (preferentemente un dominio Fc o bisagra-Fc), que contienen una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG no mutada, cuyas modificaciones aumentan la afinidad del dominio constante de IgG, o fragmento del mismo, por FcRn. En una realización preferida, la invención se refiere particularmente a la modificación de IgG humanas o humanizadas y otras moléculas bioactivas que contienen porciones de unión a FcRn de IgG humanas, que tienen uso particular en terapia humana, profilaxis y diagnóstico.

5.1 Moléculas con elevadas semividas *in vivo*

La presente invención se basa en la identificación de modificaciones de aminoácidos, en particular porciones del dominio constante de IgG que interaccionan con FcRn, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de IgG, o fragmento del mismo, por FcRn. Por consiguiente, la invención se refiere a moléculas modificadas, preferentemente proteínas, más preferentemente inmunoglobulinas, que comprenden un dominio constante de IgG, que tienen una o más sustituciones de aminoácidos, en uno o más regiones que interaccionan con FcRn, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la IgG o fragmento de la misma, por FcRn, y también aumentan la semivida *in vivo* de la molécula. En realizaciones preferidas, la una o más modificaciones de aminoácidos se hacen en uno o más de los restos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436 de la región bisagra-Fc de IgG (por ejemplo, como en la región bisagra-Fc de IgG1 humana representada en la Figura 4, SEQ ID NO:83), o restos análogos de la misma, como se ha determinado por alineamiento de secuencias de aminoácidos, en otras regiones bisagra-Fc de IgG. En una realización preferida, las modificaciones de aminoácidos se hacen en un dominio constante de IgG humana, o dominio de unión a FcRn del mismo. En una cierta realización, las modificaciones no se hacen en los restos 252, 254 o 256 (es decir, todas se hacen en uno o más de los restos 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 o 428-436) del dominio constante de IgG. En una realización más preferida, las modificaciones de aminoácidos no son la sustitución con leucina en el resto 252, con serina a 254 y/o con fenilalanina en la posición 256. En particular, en realizaciones preferidas, tales modificaciones se hacen cuando el dominio constante de IgG, dominio bisagra-Fc, dominio bisagra-Fc u otros fragmento de unión a FcRn de los mismos deriva de un ratón.

Las modificaciones de aminoácidos son sustituciones en uno o más de los restos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, que aumentan la semivida *in vivo* del dominio constante de IgG, y cualquier molécula unida al mismo, y aumentan la afinidad de la IgG, o fragmento de la misma, por FcRn. Preferentemente, la una o más modificaciones también producen una mayor afinidad de unión del dominio constante por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4. En otras realizaciones, las modificaciones alteran (es decir, aumentan o disminuyen) la biodisponibilidad de la molécula, en particular, altera (es decir, aumenta o disminuye) el transporte (o concentración o semivida) de la molécula a superficies de la mucosa (por ejemplo, de los pulmones) u otras porciones de un tejido diana. En una realización preferida, las modificaciones de aminoácidos alteran (preferentemente, aumentan) el transporte o concentración o semivida de la molécula a los pulmones. En otras realizaciones, las modificaciones de aminoácidos alteran (preferentemente, aumentan) el transporte (o concentración o semivida) de la molécula al corazón, páncreas, hígado, riñón, vejiga, estómago, intestino grueso o delgado, vías respiratorias, ganglios linfáticos, tejido nervioso (tejido nervioso central y/o periférico), músculo, epidermis, hueso, cartílago, articulaciones, vasos sanguíneos, médula ósea, próstata, ovario, útero, tumor o tejido de cáncer, etc. En una realización preferida, las modificaciones de aminoácidos no suprimen, o, más preferentemente, no alteran, otras funciones efectoras inmunitarias o de unión a receptor del dominio constante, por ejemplo, pero no se limitan a fijación del complemento, ADCC y unión a FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, como puede determinarse por métodos muy conocidos y rutinarios en la materia. En otra realización preferida, el fragmento de unión a FcRn modificado del dominio constante no contiene secuencias que medien en funciones efectoras inmunitarias u otra unión a receptor. Tales fragmentos pueden ser particularmente útiles para conjugación con una molécula no IgG o no de inmunoglobulina para aumentar la semivida *in vivo* de la misma. En otra realización más, las funciones efectoras se alteran selectivamente (por ejemplo, para reducir o aumentar las funciones efectoras).

En realizaciones preferidas, las modificaciones de aminoácidos son sustituciones en uno o más de los restos 308, 309, 311, 312 y 314, particularmente una sustitución con treonina en la posición 308, prolina en la posición 309, serina en la posición 311, ácido aspártico en la posición 312 y/o leucina en la posición 314. Alternativamente, la modificación es la sustitución con una isoleucina en la posición 308, prolina en la posición 309 y/o un ácido glutámico en la posición 311. En otra realización más, restos en una o más de las posiciones 308, 309, 311, 312 y 314 están sustituidos con treonina, prolina, leucina, alanina, y alanina, respectivamente. Por consiguiente, en ciertas realizaciones el resto en la posición 308 está sustituido con treonina o isoleucina, el resto en la posición 309 está sustituido con prolina, el resto en la posición 311 está sustituido con serina, ácido glutámico o leucina, el resto en la posición 312 está sustituido con alanina, y/o el resto en la posición 314 está sustituido con leucina o alanina. En una realización preferida, la sustitución es una treonina en la posición 308, una prolina en la posición 309, una serina en la posición 311, un ácido aspártico en la posición 312 y/o una leucina en la posición 314.

En realizaciones preferidas, las modificaciones de aminoácidos son sustituciones en uno o más de los restos 251, 252, 254, 255 y 256. En realizaciones específicas, el resto 251 está sustituido con leucina o arginina, el resto 252 está sustituido con tirosina, fenilalanina, serina, triptófano o treonina, el resto 254 está sustituido con treonina o serina, el resto 255 está sustituido con arginina, leucina, glicina o isoleucina, y/o el resto 256 está sustituido con serina, arginina, glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, asparagina o treonina. En una realización más específica, el resto 251 está sustituido con leucina, el resto 252 está sustituido con tirosina, el resto 254 está sustituido con treonina o serina, el resto 255 está sustituido con arginina, y/o el resto 256 está sustituido con ácido glutámico.

En realizaciones preferidas, las modificaciones de aminoácidos son sustituciones en uno o más de los restos 428, 433, 434 y 436. En realizaciones específicas, el resto 428 está sustituido con treonina, metionina, leucina, fenilalanina o serina.

En realizaciones preferidas, las modificaciones de aminoácidos son sustituciones en uno o más de los restos 385, 386, 387 y 389, más específicamente, que tienen sustituciones en una o más de estas posiciones. En realizaciones específicas, el resto 385 está sustituido con arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina o glicina, el resto 386 está sustituido con treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina o metionina, el resto 387 está sustituido con arginina, prolina, histidina, serina, treonina o alanina, y/o el resto 389 está sustituido con prolina, serina o asparagina. En realizaciones más específicas, restos en una o más de las posiciones 385, 386, 387 y 389 están sustituidos con arginina, treonina, arginina y prolina, respectivamente. En otra realización específica más, restos en una o más de las posiciones 385, 386 y 389 están sustituidos con ácido aspártico, prolina y serina, respectivamente.

En realizaciones particulares, las modificaciones de aminoácidos se hacen en uno o una combinación de los restos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 y/o 436, particularmente donde las modificaciones son una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas inmediatamente anteriormente para estos restos. En una realización preferida, la molécula de la invención contiene una región Fc, o dominio de unión a FcRn del mismo, que tiene una o más de las siguientes sustituciones: leucina en el resto 251, tirosina en el resto 252, treonina o serina en el resto 254, arginina en el resto 255, treonina en el resto 308, prolina en el resto 309, serina en el resto 311, ácido aspártico en el resto 312, leucina en el resto 314, arginina en el resto 385, treonina en el resto 386, arginina en el resto 387, prolina en el resto 389, metionina en el resto 428.

En una realización preferida, el dominio de unión a FcRn tiene una sustitución en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 o los 18 de los restos 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 y/o 436.

Pueden hacerse modificaciones de aminoácidos por cualquier método conocido en la técnica y muchos de tales métodos son muy conocidos y rutinarios para el experto. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, pueden llevarse a cabo sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos usando cualquier técnica basada en PCR muy conocida. Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos por mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Zoller y Smith, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500, 1982; Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488, 1985). Pueden cribarse fácilmente mutantes que producen elevada afinidad por FcRn y elevada semivida *in vivo* usando ensayos muy conocidos y rutinarios, tales como aquellos descritos en la Sección 5.11, abajo. En un método preferido, se introducen sustituciones de aminoácidos en uno o más restos en el dominio constante de IgG o fragmento de unión a FcRn del mismo y los dominios constantes mutados o fragmentos se expresan sobre la superficie de bacteriófago que entonces se criban para elevada afinidad de unión por FcRn (véase, en particular, la Sección 5.2 y 5.11, abajo).

Preferentemente, los restos de aminoácidos que van a modificarse son restos expuestos en la superficie. Adicionalmente, en la preparación de sustituciones de aminoácidos, preferentemente el resto de aminoácido que va a ser sustituido es una sustitución de aminoácidos conservativa, por ejemplo, un resto polar está sustituido con un resto polar, un resto hidrófilo con un resto hidrófilo, el resto hidrófobo con un resto hidrófobo, un resto positivamente cargado con un resto positivamente cargado, o un resto negativamente cargado con un resto negativamente cargado. Además, preferentemente, el resto de aminoácido que va a modificarse no está altamente o completamente conservado a través de especies y/o es crítico para mantener la estructura terciaria del dominio

constante o para unión a FcRn. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, no se prefiere la modificación de la histidina en el resto 310.

- 5 Mutantes específicos del dominio Fc que tienen elevada afinidad por FcRn que se aislaron después de la tercera ronda de inmunopurificación (como se describe en la Sección 6) a partir de una biblioteca de moléculas de IgG1 humana mutante que tenía mutaciones en los restos 308-314 (histidina en la posición 310 y triptófano en la posición 313 están fijos), aquellos aislados después de la quinta ronda de inmunopurificación de la biblioteca para los restos 251-256 (isoleucina en la posición 253 está fija), aquellos aislados después de la cuarta ronda de inmunopurificación de la biblioteca para los restos 428-436 (histidina en la posición 429, ácido glutámico en la posición 430, alanina en la posición 431, leucina en la posición 432 e histidina en la posición 435 están fijos), y aquellos aislados después de la sexta ronda de inmunopurificación de la biblioteca para los restos 385-389 (ácido glutámico en la posición 388 está fijo) se enumeran en la Tabla I. La IgG1 humana no mutante tiene una secuencia Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu (SEQ ID NO:86) en las posiciones 308-314, Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr (SEQ ID NO:87) en las posiciones 251-256, Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr (SEQ ID NO:88) en las posiciones 428-436 y Gly-Gln-Pro-Glu-Asn (SEQ ID NO:89) en las posiciones 385-389.

Tabla I

MUTANTES AISLADOS POR INMUNOPURIFICACIÓN	
BIBLIOTECA	MUTANTES*
251-256	<u>Leu Tyr Ile Thr Arg Glu</u> (SEQ ID NO:90)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:91)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Ser</i> (SEQ ID NO:92)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:93)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Gln</i> (SEQ ID NO:94)
	<i>Leu Trp Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:95)
	<i>Leu Tyr Ile Ser Leu Gln</i> (SEQ ID NO:96)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Asp</i> (SEQ ID NO:97)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:98)
	<i>Leu Phe Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:99)
	<i>Leu Phe Ile Thr Gly Ala</i> (SEQ ID NO:100)
	<i>Leu Ser Ile Ser Arg Glu</i> (SEQ ID NO:101)
	<i>Arg Thr Ile Ser Ile Ser</i> (SEQ ID NO:102)
	<i>Thr Pro His Ser Asp Trp Leu</i> (SEQ ID NO:103)
<i>Ile Pro His Glu Asp Trp Leu</i> (SEQ ID NO:104)	
385-389	<u>Arg Thr Arg Glu Pro</u> (SEQ ID NO:105)
	<i>Asp Pro Pro Glu Ser</i> (SEQ ID NO:106)
	<i>Ser Asp Pro Glu Pro</i> (SEQ ID NO:107)
	<i>Thr Ser His Glu Asn</i> (SEQ ID NO:108)
	<i>Ser Lys Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:109)
	<i>His Arg Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO: 110)
	<i>Lys Ile Arg Glu Asn</i> (SEQ ID NO: 111)
<i>Gly Ile Thr Glu Ser</i> (SEQ ID NO:112)	
<i>Ser Met Ala Glu Pro</i> (SEQ ID NO:113)	
428-436	<u>Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His</u> (SEQ ID NO:114)
	<i>Met His Glu Ala Leu His Phe His His</i> (SEQ ID NO:115)
	<i>Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His</i> (SEQ ID NO:116)
	<i>Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg</i> (SEQ ID NO:117)
	<i>Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr</i> (SEQ ID NO:118)
	<i>Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr</i> (SEQ ID NO:119)

* Los restos de sustitución se indican en negrita

- 20 Las secuencias subrayadas en la Tabla I se corresponden con las secuencias que ocurrieron 10 a 20 veces en la ronda final de inmunopurificación y las secuencias en cursiva se corresponden con las secuencias que ocurrieron 2 a 5 veces en la ronda final de inmunopurificación. Aquellas secuencias que ni están subrayadas ni en cursiva ocurrieron una vez en la ronda final de inmunopurificación.

- 25 En una realización preferida, la invención proporciona moléculas modificadas de inmunoglobulina (por ejemplo, diversos anticuerpos) que tienen elevada semivida *in vivo* y afinidad por FcRn con respecto a moléculas no modificadas (y, en realizaciones preferidas, biodisponibilidad alterada tal como transporte elevado o reducido a superficies de la mucosa u otros tejidos diana). Tales moléculas de inmunoglobulina incluyen moléculas de IgG que contienen naturalmente un dominio de unión a FcRn y otras inmunoglobulinas no IgG (por ejemplo, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o fragmentos de inmunoglobulinas que han sido manipulados para contener un fragmento de unión a FcRn (es decir, proteínas de fusión que comprenden inmunoglobulina no IgG o una porción de la misma y un

30

dominio de unión a FcRn). En ambos casos, el dominio de unión a FcRn tiene una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad del fragmento de dominio constante por FcRn.

Las inmunoglobulinas modificadas incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une (preferentemente, inmuno-específicamente, es decir, compete fuera la unión no específica), como se ha determinado por inmunoensayos muy conocidos en la técnica para ensayar la unión específica antígeno-anticuerpo) a un antígeno y contiene un fragmento de unión a FcRn. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos por disulfuro y fragmentos que contienen ya sea un dominio VL o VH o incluso una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, manipulada para contener o fusionada con un dominio de unión a FcRn.

Las moléculas de IgG de la invención, y fragmentos de unión a FcRn de las mismas, son preferentemente subclases 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. Se sabe que ciertas subclases de IgG, por ejemplo, IgG2b e IgG2c de ratón, tienen velocidades de eliminación más altas que, por ejemplo, IgG1 (Medesan et al., Eur. J. Immunol., 28:2092-2100, 1998). Así, si se usan subclases de IgG distintas de IgG1, puede ser ventajoso sustituir uno o más de los restos, particularmente en los dominios CH2 y CH3, que se diferencian de la secuencia de IgG1 con aquellos de IgG1, aumentando así la semivida *in vivo* de los otros tipos de IgG.

Las inmunoglobulinas (y otras proteínas usadas en el presente documento) pueden ser de cualquier origen animal que incluye aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humanos, de roedor (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo. Como se usa en el presente documento, 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, como se describe abajo y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.939.598 por Kucherlapati et al.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, biespecíficos, trispecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopes de un polipéptido o pueden ser específicos para epítopes heterólogos, tales como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol., 147:60-69, 1991; las patentes de EE.UU. N.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553, 1992.

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 forma que la unión covalente no prevenga que el anticuerpo se una al antígeno y/o genere una respuesta anti-idiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, y no al método por el que se produce.

Métodos de producción y cribado de anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son rutinarios y muy conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un antígeno de interés o una célula que expresa un antígeno tal. Una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan entonces por técnicas muy conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitante. Entonces se ensayan los clones de hibridoma por métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno. Puede generarse líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopes específicos por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa y la región variable, la región CH1 y la región bisagra de la cadena pesada.

Por ejemplo, también puede generarse anticuerpos usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, dominios de anticuerpo funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, tal fago puede utilizarse para presentar dominios de unión al antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado por enlace disulfuro, expresado de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos normalmente es fago filamentosos, que incluye fd y M13. Los dominios de unión al antígeno se expresan como una proteína recombinantemente fusionada con cualquiera del gen III de fago o proteína del gen VIII. Alternativamente, la porción de unión a FcRn modificada de inmunoglobulinas de la presente invención también puede expresarse en un sistema de presentación en fagos.

Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar las inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic et al., Gene, 187:9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; solicitud PCT N.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. N.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108;

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fago, las regiones codificantes de anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, que incluye células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques, 12(6):864-869, 1992; y Sawai et al., AJRI, 34:26-34, 1995; y Better et al., Science, 240:1041-1043, 1988. Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs y anticuerpos monocatenarios incluyen aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203:46-88, 1991; Shu et al., PNAS, 90:7995-7999, 1993; y Skerra et al., Science, 240:1038-1040, 1988.

Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes especies de animal, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante derivada de una inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos quiméricos. 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; las patentes de EE.UU. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen el antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, restos de la región estructural en las regiones estructurales humanas estarán sustituidos con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región estructural se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de CDR y restos de la región estructural para identificar restos de la región estructural importantes para unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos poco usuales de la región estructural en las posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen et al., patente de EE.UU. N.º 5.585.089; Riechmann et al., Nature, 332:323, 1988. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento superficial (documentos 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 barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332).

Son particularmente deseables anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes de EE.UU. N.º 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.

- 5 También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de la inmunoglobulina humana. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93, 1995. Para una discusión detallada de esa tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos véanse, por ejemplo, las
- 10 publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente europea N.º 0 598 877; patentes de EE.UU. N.º 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. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San Jose, CA) pueden comprometerse para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.
- 15 Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespersen et al., *Bio/technology*, 12:899-903, 1988).
- 20 En realizaciones particulares, los anticuerpos modificados tienen usos terapéuticos y/o profilácticos *in vivo*. Ejemplos de anticuerpos terapéuticos y profilácticos que pueden ser así modificados incluyen, pero no se limitan a, SYNAGIS® (MedImmune, MD) que es un anticuerpo monoclonal anti-virus respiratorio sincitial (VRS) humanizado para el tratamiento de pacientes con infección por VRS; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico;
- 25 REMICADE® (infliximab) (Centocor, PA) que es un anticuerpo monoclonal anti-TNF α quimérico para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn; REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glucoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención de rechazo agudo de aloinjerto renal. Otros ejemplos son un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Genentech);
- 30 CDP860 que es un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Celltech, UK); PRO542 que es un anticuerpo anti-gp120 del VIH fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); Ostavir que es un anticuerpo anti-virus de la hepatitis B humano (Protein Design Lab/Novartis); PROTOVIR™ que es un anticuerpo IgG1 anti-CMV humanizado (Protein Design Lab/Novartis); MAK-195 (SEGARD) que es un F(ab')₂ anti-TNF- α murino (Knoll Pharma/BASF); IC14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); OVAREX™ que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a anti-antígeno de superficie de células 17-1A murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG antidiotípico (epítipo GD3) murino (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo anti-IgG de EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-integrina α V β 3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD52 humanizado (Leucosite); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LINFOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); Smart ID10 que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYM™ (Lym-1) es un anticuerpo anti-HLA DIAGNOSTIC REAGENT murino radiomarcado (Techniclone); ABX-IL8 es un anticuerpo anti-IL8 humano (Abgenix); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genentech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-1 14 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor del complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF- α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LeucoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo (Fc γ R) anti-CD64 humano (Medarex/Centeon); SCH55700 es un anticuerpo IgG4 anti-IL-5 humanizado (Celltech/Schering); SB-240563 y SB-240683 son anticuerpos anti-IL-5 e IL-4 humanizados, respectivamente (SmithKline Beecham); rhuMab-E25 es un anticuerpo IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharm); ABX-CBL es un anticuerpo IgM anti-CD-147 murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG anti-CD2 de rata (MedImmune/Bio Transplant); OrthoClone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a anti-CD3 murino (Ortho Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo IgG anti- β ₂-integrina humanizado (LeucoSite); Anti-LFA-1 es un F(ab')₂ anti-CD18 murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β ₂ humano (Cambridge Ab Tech); y Corsevin M es un anticuerpo anti-factor VII quimérico (Centocor).
- 65

5 En realizaciones específicas, la invención proporciona anticuerpos modificados que tienen una o más de las mutaciones descritas en el presente documento y que se unen inmuno-específicamente a VRS, por ejemplo, SYNAGIS[®]. La presente invención también proporciona anticuerpos modificados que tienen una o más de las mutaciones descritas en el presente documento y que comprenden un dominio pesado variable (VH) y/o ligero variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH y/o VL enumerado en la Tabla III. La presente invención engloba además anticuerpos anti-VRS que comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) VH y/o una o más CDR VL que tienen la secuencia de aminoácidos de una o más CDR VH y/o CDR VL enumeradas en la Tabla III o una o más de las CDR enumeradas en la Tabla II en la que uno o más de los restos en negrita y subrayados tienen una sustitución de aminoácidos, preferentemente que aumenta la afinidad del anticuerpo por VRS. En realizaciones específicas, el anticuerpo que va a modificarse es AFFF, p12f2, p12f4, p11d4, Ale109, A12a6, A13c4, A17d4, A4B4, A8C7, 1X-493L1FR, H3-3F4, M3H9, Y10H6 DG, AFFF(1), 6H8, L1-7E5, L215B10, A13A11, A1H5, A4B4(1), A4B4L1FR-S28R, A4B4-F52S.

Tabla II.
Secuencias de CDR de SYNAGIS[®]

CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	<u>TSGMSVG</u>	1
VH2	DIWWDD <u>KKDYNPSLKS</u>	2
VH3	<u>SMITN</u> WYFDV	3
VL1	<u>KCOLSVGYMH</u>	4
VL2	<u>DTSK</u> LAS	5
VL3	FQGS <u>GYPET</u>	6

15

Tabla III
ANTICUERPOS ANTI-1VRS

Nombre de anticuerpo	Dominio VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH	Dominio VL	CDR1 VL2	CDR2 VL	CDR3 VL
SYNAGIS	SEQ ID NO:7	TGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	SMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:8	KCQLSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:4)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
AFFF	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	SMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:13	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQESGY ^{PFT} (SEQ ID NO:16)
p1212	SEQ ID NO:17	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:21	SLSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:22)	DTEYLSS (SEQ ID NO:23)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
p1214	SEQ ID NO:24	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:26	SLSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:22)	DTRGLPS (SEQ ID NO:27)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
p1144	SEQ ID NO:28	TPGMSVG (SEQ ID NO:18)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:30	SPSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:31)	DTMRLAS (SEQ ID NO:32)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
Ale109	SEQ ID NO:33	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:34	SLSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:22)	DTEKLSS (SEQ ID NO:35)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A12a6	SEQ ID NO:36	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:38	SASSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:39)	DTEKLSS (SEQ ID NO:35)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A13c4	SEQ ID NO:40	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKSYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:42	SLSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:22)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A17a4	SEQ ID NO:44	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKSYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:46	LPSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:41)	DTMYQSS (SEQ ID NO:43)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A8C7	SEQ ID NO:51	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKSYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:52	SPSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:31)	DTRYOSS (SEQ ID NO:53)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
1X-493L1FR	SEQ ID NO:7	TGMSVG (SEQ ID NO:1)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	SMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:54	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
H3-3F4	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:56	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
M3H9	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:57	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTYKQTS (SEQ ID NO:58)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
Y10H6	SEQ ID NO:55	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:59	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTRYLSS (SEQ ID NO:6)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
DG	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:56	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
AFFF(1)	SEQ ID NO:9	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	SMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:60	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
6H8	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:62	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTEKLTS (SEQ ID NO:63)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
L1-7E5	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:64	SASSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:39)	DTEKLAS (SEQ ID NO:15)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
L215B10	SEQ ID NO:78	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKDYNP ^{SLK} _S	DMITNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:65	SASSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:14)	DTRFLAS (SEQ ID NO:66)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A13A11	SEQ ID NO:67	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:68	SPSSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:31)	DTYRHSS (SEQ ID NO:69)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A1H5	SEQ ID NO:70	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDGKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:29)	SEQ ID NO:71	SLSSSVGY ^{MH} (SEQ ID NO:72)	DTFFHRS (SEQ ID NO:73)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A4B4(1)	SEQ ID NO:	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:74	SASSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:39)	DTLLDLS (SEQ ID NO:75)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)
A4B4LIF-R- S28R	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDKKHYNP ^{SLK} _D	DMIFNWF ^{FDV} (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:11	SASSRVGY ^{MH} (SEQ ID NO:39)	DTSKLAS (SEQ ID NO:5)	FQSGGY ^{PFT} (SEQ ID NO:6)

ANTICUERPOS ANTI-VRS								
Nombre de anticuerpo	Dominio VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3VH	Dominio VL	CDR1 VL2	CDR2 VL	CDR3 VL
A4B4-F52S	SEQ ID NO:48	TAGMSVG (SEQ ID NO:10)	DIWDDK K H Y N F SLK D (SEQ ID NO:19)	D M I E N E F D V (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:76	S A S S R V G Y M H (SEQ ID NO:39)	DTSELDS (SEQ ID NO:77)	FGSGYPFT (SEQ ID NO:6)

En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$ modificado, preferentemente un anticuerpo Vitaxin (véanse las publicaciones PCT WO 98/33919 y WO 00/78815, ambas por Huse et al.).

5 IgG modificadas de la presente invención que tienen semividas más largas que las mutadas también pueden incluir IgG cuyos sitios bioactivos, tales como sitios de unión al antígeno, sitios de unión al receptor de Fc, o sitios de unión al complemento, se modifican por ingeniería genética para aumentar o reducir tales actividades en comparación con las mutadas.

10 La modificación de estos y otros anticuerpos terapéuticos para aumentar la semivida *in vivo* permite la administración de dosificaciones eficaces más bajas y/o dosificación menos frecuente del anticuerpo terapéutico. Tal modificación para aumentar la semivida *in vivo* también puede ser útil para mejorar también las inmunoglobulinas de diagnóstico, por ejemplo, permitiendo la administración de dosis más bajas para lograr sensibilidad de diagnóstico suficiente.

15 La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden una molécula bioactiva y una región constante de IgG (preferentemente humana) que tiene una o más modificaciones (es decir, sustituciones, deleciones o inserciones) en restos de aminoácidos identificados por estas implicados en la interacción entre la región bisagra-Fc y el receptor FcRn. En particular, la presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden una molécula bioactiva recombinantemente fusionada o químicamente conjugada (incluyendo tanto
20 conjugaciones covalentes como no covalentes) con un dominio constante de IgG que comprende un dominio CH2 humano que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290 y/o restos de aminoácidos 308-314, y/o con un dominio CH3 que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 385-389 y/o 428-436, en particular, una o más de las sustituciones de aminoácidos tratadas anteriormente. La fusión de una molécula bioactiva con un dominio constante o un fragmento del mismo con uno o más de tales
25 modificaciones aumenta la semivida *in vivo* de la molécula bioactiva.

En una realización preferida, las proteínas de fusión de la invención comprenden una molécula bioactiva recombinantemente fusionada o químicamente conjugada con un dominio constante de IgG que comprende un dominio CH2 humano que tiene una o más sustituciones de restos de aminoácido en los restos de aminoácidos 251-
30 256, 285-290 y/o restos de aminoácidos 308-314, y/o con un dominio CH3 que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 385-389 y/o 428-436. En ciertas realizaciones, una proteína de fusión comprende un dominio constante de IgG que comprende un dominio CH2 humano de molécula de IgG en el que los restos de aminoácidos 253, 310 y 313 no están modificados. En otras realizaciones, una proteína de fusión comprende un dominio CH3 de molécula de IgG en el que los restos de aminoácidos 388, 429, 430, 431, 432 y 435 no están
35 modificados.

Una molécula bioactiva puede ser cualquier polipéptido o fármaco sintético conocido para un experto en la materia. Preferentemente, una molécula bioactiva es un polipéptido que consiste en al menos 5, preferentemente al menos
40 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 restos de aminoácidos. Ejemplos de polipéptidos bioactivos incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de anticuerpos, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- γ , IFN- α e IFN- β), moléculas de adhesión a células (por ejemplo, CTLA4, CD2 y CD28), ligandos (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , y un factor antiangiogénico tal como endostatina), receptores, anticuerpos y factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF, EGF, NGF y KGF).
45

Una molécula bioactiva también puede ser 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.). Ejemplos de agentes citostáticos o citocidas incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-
50 deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de la misma. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino),
55 antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

60 La presente invención también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una IgG modificada de la invención y fragmentos de la misma que contienen los sitios de unión a FcRn modificados con elevada afinidad y vectores que comprenden dichos polinucleótidos. Además, la invención incluye polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o rigurosas más bajas con polinucleótidos que codifican IgG modificadas de la presente invención.
65

La secuencia de nucleótidos de IgG modificadas y los polinucleótidos que codifican la misma pueden obtenerse por cualquier método conocidos en la técnica, que incluye método general de secuenciación de ADN, tal como método de terminación de cadenas didesoxi (secuenciación de Sanger), y cebado de oligonucleótidos en combinación con PCR, respectivamente.

5.2. Identificación de mutaciones dentro de la región bisagra-Fc de moléculas de inmunoglobulina

Pueden introducirse una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436 del dominio constante utilizando cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia. El dominio constante o fragmento del mismo que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436 puede cribarse, por ejemplo, por un ensayo de unión para identificar el dominio constante o fragmento del mismo con elevada afinidad por el receptor FcRn (por ejemplo, como se describe en la Sección 5.11, abajo). Aquellas modificaciones en el dominio bisagra-Fc o los fragmentos del mismo que aumentan la afinidad del dominio constante o fragmento del mismo por el receptor FcRn pueden introducirse en anticuerpos para aumentar las semividas *in vivo* de dichos anticuerpos. Además, aquellas modificaciones en el dominio constante o el fragmento del mismo que aumentan la afinidad del dominio constante o fragmento del mismo por FcRn pueden fusionarse con moléculas bioactivas para aumentar las semividas *in vivo* de dichas moléculas bioactivas (y, preferentemente alterar (aumentar o disminuir) la biodisponibilidad de la molécula, por ejemplo, para aumentar o disminuir el transporte a superficies de la mucosa (u otro tejido diana) (por ejemplo, los pulmones).

5.2.1. Mutagénesis

Puede realizarse mutagénesis según cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, sintetizar un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones dentro de la secuencia del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, el dominio CH2 o CH3) que va a modificarse. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, además de un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una primer secuencia de tamaño y complejidad de secuencia suficiente para formar un dúplex estable en ambos lados del empalme de delección que se atraviesa. Normalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a aproximadamente 75 nucleótidos o más de longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o más restos en ambos lados del empalme de la secuencia que se altera. Pueden usarse varios de tales cebadores que introducen una variedad de diferentes mutaciones en una o más de las posiciones para generar una biblioteca de mutantes.

La técnica de mutagénesis específica de sitio es muy conocida en la técnica, como se ejemplifica por diversas publicaciones (véase, por ejemplo, Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-82, 1987). En general, la mutagénesis dirigida al sitio se realiza obteniendo primero un vector monocatenario o fundiendo separadas las dos hebras de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador de oligonucleótidos que lleva la secuencia mutada deseada, generalmente sintéticamente. Este cebador se hibrida entonces con el vector monocatenario, y se somete a enzimas de polimerización de ADN tales como ADN polimerasa T7, con el fin de completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra lleva la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa 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 normalmente emplea un vector de fago que existe en tanto una forma monocatenaria como bicatenaria. Vectores útiles típicos en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente comercialmente disponibles y su uso es generalmente muy conocido para aquellos expertos en la materia. También se emplean rutinariamente plásmidos bicatenarios en la mutagénesis dirigida al sitio que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

Alternativamente, el uso de PCRTM con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como ADN polimerasa Taq puede usarse para incorporar un cebador de oligonucleótidos mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de clonación o de expresión apropiado. Véanse, por ejemplo, Tomic et al., *Nucleic Acids Res.*, 18(6):1656, 1987, y Upende et al., *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995, para los procedimientos de mutagénesis mediada por PCRTM. También puede usarse PCRTM empleando una ligasa termoestable, además de una polimerasa termoestable, para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de clonación o de expresión apropiado (véase, por ejemplo, Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994).

Pueden usarse otros métodos conocidos para aquellos expertos en la materia de producción de variantes de secuencia del dominio Fc de un anticuerpo o un fragmento del mismo. Por ejemplo, pueden tratarse vectores recombinantes que codifican la secuencia de aminoácidos del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento del mismo con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

5.2.2. Inmunopurificación

Puede cribarse vectores, en particular, fago, que expresan dominios constantes o fragmentos de los mismos que tienen una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436, para identificar dominios constantes o fragmentos de los mismos que tienen elevada afinidad por FcRn para seleccionar los ligantes de mayor afinidad de una población de fagos. Inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión del dominio constante o fragmento del mismo que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436 al FcRn incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich" e inmunoensayos fluorescentes. Tales ensayos son rutinarios y muy 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). Inmunoensayos a modo de ejemplo se describen brevemente en el presente documento a continuación (pero no están previstos a modo de limitación). También puede usarse análisis cinético BIAcore para determinar las constantes de asociación y disociación de unión de un dominio constante o un fragmento del mismo que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436 al FcRn. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un dominio constante o un fragmento del mismo que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436 de chips con FcRn inmovilizado sobre su superficie (véase la Sección 5.1 y la sección de ejemplos abajo).

5.2.3. Secuenciación

Puede usarse cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente la secuencia de nucleótidos que codifica los dominios constantes o fragmentos de los mismos que tienen una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y 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), que incluyen secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 94/16101, Cohen et al., Adv. Chromatogr., 36:127-162, 1996, y Griffin et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 38:147-159, 1993).

5.3. Métodos recombinantes de producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferentemente por técnicas de expresión recombinante.

La secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo puede obtenerse de cualquier información disponible para aquellos expertos en la materia (es decir, de Genbank, la bibliografía, o por clonación rutinaria). Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular o un fragmento de unión al epítipo del mismo no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión al epítipo del mismo es conocida, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina u obtenerse a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir, o ácido nucleico, preferentemente ARN de poli A⁺, aislado de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o clonando usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden entonces clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

Una vez se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos muy conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, introduciendo sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en las regiones de dominio de unión al epítipo de los anticuerpos y preferentemente en las regiones bisagra-Fc de los anticuerpos que participan en la interacción con FcRn. En una realización preferida, se generan anticuerpos que tienen una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436.

La expresión recombinante de un anticuerpo requiere la construcción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo. Una vez ha sido obtenida una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción de la misma (preferentemente, pero no necesariamente, que contiene la región variable de la cadena pesada o ligera), el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando

técnicas muy conocidas en la técnica. Así, se describen en el presente documento métodos de preparación de una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica la secuencia de nucleótidos. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, así, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo con una o más modificaciones en los restos de aminoácidos implicados en la interacción con FcRn (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de EE.UU. N.º 5.122.464). La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, tanto las regiones variables de cadena pesada como de cadena ligera, un fragmento de unión al epítipo de la región variable de cadena pesada y/o ligera, o una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo puede clonarse en un vector tal para la expresión.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo que tiene una elevada afinidad por FcRn y una elevada semivida *in vivo*. Así, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un dominio constante que tiene una o más modificaciones en los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y/o 428-436, preferentemente, operativamente unido a un promotor heterólogo.

Puede utilizarse una variedad de sistemas huésped-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Tales sistemas huésped-expresión representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de planta infectados 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 plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; y sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3 y NSO) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus de la variolovacuna). Preferentemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completo, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., *Gene*, 45:101, 1986, y Cockett et al., *Bio/Technology*, 8:2, 1990).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión que dependen del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de 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 se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO*, 12:1791, 1983), en el que la secuencia codificante de anticuerpos puede unirse individualmente en el vector en marco con la región codificante lacZ de manera que se produzca una proteína de fusión; y vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985 y Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 24:5503-5509, 1989).

En un sistema de insecto, se usa 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 de los anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede unirse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:355-359, 1984). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la

eficiente traducción de secuencias codificantes insertadas de anticuerpos. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544, 1987).

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras que modula la expresión de las secuencias de anticuerpo, o modifica y procesa el anticuerpo en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función del anticuerpo. Células hospedadoras diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento del anticuerpo expresado.

Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, y en particular células de mieloma tales como células NS0 y líneas celulares relacionadas, véase, por ejemplo, Morrison et al., patente de EE.UU. N.º 5.807.715.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de anticuerpos recombinantes, se prefiere expresión estable.

Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, las células manipuladas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren establemente en el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan el anticuerpo. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de composiciones que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977), hipoxantinaganina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202, 1992) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell*, 22:8-17, 1980) pueden emplearse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357, 1980 y O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, *Biotherapy*, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596, 1993; Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217, 1993; y May, *TIB TECH*, 11(5):155-2 15, 1993); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden ser rutinariamente aplicados para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, 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; en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; y Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981, que se incorporan por referencia en el presente documento en sus totalidades.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, 1987, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. Academic Press, Nueva York). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada al gen de anticuerpo, también aumentará la producción de anticuerpo Crouse et al., *Mol., Cell. Biol.*, 3:257, 1983).

La célula hospedadora puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera o marcadores de selección diferentes para asegurar el mantenimiento de ambos plásmidos. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, tanto

polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature, 322:52, 1986; y Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2 197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de purificación en Proteína A, y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

5.3.1. Conjugados de anticuerpo

La presente invención engloba anticuerpos recombinantemente fusionados o químicamente conjugados (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) con polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido sin relacionar; o porción del mismo, preferentemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no necesita ser necesariamente directa, pero puede producirse mediante secuencias conectoras. Anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos también pueden usarse en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 93/21232; documento EP 439,095; Naramura et al., Immunol. Lett., 39:91-99, 1994; la patente de EE.UU. 5.474.981; Gillies et al., PNAS, 89:1428-1432, 1992; y Fell et al., J. Immunol., 146:2446-2452, 1991.

Pueden fusionarse anticuerpos con secuencias de marcador, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca 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., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, 1989, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca de hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítopo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell, 37:767 1984) y la marca "flag" (Knappik et al., Biotechniques, 17(4):754-761, 1994).

La presente invención también engloba anticuerpos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la semivida *in vivo*. Los anticuerpos pueden usarse diagnósticamente 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 una pauta de tratamiento dada. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea directamente al anticuerpo o indirectamente mediante un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnósticos según la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luciferina; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Un anticuerpo puede conjugarse con 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.). Citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de la misma. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, un anticuerpo puede conjugarse con un agente terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Agentes terapéuticos o restos de fármaco no deben interpretarse 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*, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador tisular del plasminógeno (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I como se desvela en la publicación PCT N.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación PCT N.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *J. Immunol.*, 6:1567-1574, 1994) y VEGF (publicación PCT N.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina); o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento ("GH")).

Técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos son muy 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, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; y Thorpe et al., *Immunol. Recombinant expression vector*, 62:119-58, 1982.

Puede usarse un anticuerpo o fragmento del mismo, con o sin un resto terapéutico conjugada con él, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) como agente terapéutico.

Alternativamente, puede conjugarse un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe por Segal en la patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

También pueden unirse anticuerpos 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, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 Métodos de producción de proteínas de fusión

Pueden producirse proteínas de fusión por técnicas de ADN recombinante convencionales o por técnicas sintéticas de proteínas, por ejemplo, por uso de un sintetizador de péptidos. Por ejemplo, puede sintetizarse una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos de genes usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden posteriormente hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Además, un ácido nucleico que codifica una molécula bioactiva puede clonarse en un vector de expresión que contiene el dominio Fc o un fragmento del mismo de forma que la molécula bioactiva se una en marco al dominio constante o fragmento del mismo.

Métodos de fusión o conjugación de los polipéptidos con las regiones constantes de anticuerpos se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095 y 5.112.946; documentos EP 307.434; EP 367.166; EP 394.827; publicaciones PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 y WO 99/04813; Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10535-10539, 1991; Traunecker et al., *Nature*, 331:84-86, 1988; Zheng et al., *J. Immunol.*, 154:5590-5600, 1995; y Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11337-11341, 1992.

La secuencia de nucleótidos que codifica una molécula bioactiva puede obtenerse de cualquier información disponible para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, de Genbank, la bibliografía, o por clonación rutinaria), y la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante o un fragmento del mismo con elevada afinidad por FcRn puede determinarse por análisis de secuencias de mutantes producidas usando técnicas descritas en el presente documento, o puede obtenerse de Genbank o la bibliografía. La secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteínas insertada. Puede utilizarse una variedad de sistemas de hospedador-vector en la presente invención para expresar la secuencia codificante de proteínas. Éstos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus de la variolovacuna, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como vectores de levadura que contienen levadura; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido, o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de

vectores varían en sus concentraciones y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados.

La expresión de una proteína de fusión puede controlarse por cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica. Promotores que pueden usarse para controlar la expresión del gen que codifica la proteína de fusión incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature, 290:304-310, 1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., Cell, 22:787-797, 1980), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1441-1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature, 296:39-42, 1982), el promotor de tetraciclina (Tet) (Gossen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1995); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de β -lactamasa (Villa-Kamaroff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-3731, 1978), o el promotor *tac* (DeBoer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25, 1983; véase también "Useful proteins from recombinant bacteria", en Scientific American, 242: 74-94, 1980); vectores de expresión en plantas que comprenden la región promotora de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature, 303:209-213, 1983) o el promotor de 35S ARN del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, et al., Nucl. Acids Res., 9:2871, 1981), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature, 310:115-120, 1984); elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor de PGK (fosfoglicerol cinasa), promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcionales de animal, que presentan especificidad de tejido y han sido utilizadas en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38:639-646, 1984; Ornitz et al., 50:399-409, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986; MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987); región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, Nature 315:115-122, 1985), región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., Cell, 38:647-658, 1984; Adames et al., Nature 318:533-538, 1985; Alexander et al., Mol. Cell. Biol., 7:1436-1444, 1987), región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell, 45:485-495, 1986), región de control del gen de albúmina que es activa en hígado (Pinkert et al., Genes and Devel., 1:268-276, 1987), región de control del gen de α -fetoproteína que es activa en hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol., 5:1639-1648, 1985; Hammer et al., Science, 235:53-58, 1987); región de control del gen de α 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., Genes and Devel., 1:161-171, 1987), región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam et al., Nature, 315:338-340, 1985; Kollias et al., Cell, 46:89-94, 1986; región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead et al., Cell, 48:703-712, 1987); región de control del gen de la cadena ligera-2 de miosina que es activa en músculo esquelético (Sani, Nature, 314:283-286, 1985); enolasa específica neuronal (NSE) que es activa en células neuronales (Morelli et al., Gen. Virol., 80:571-83, 1999); región de control del gen de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que es activa en células neuronales (Tabuchi et al., Biochem. Biophys. Res. Comprising., 253:818-823, 1998); promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) que es activa en astrocitos (Gomes et al., Braz. J. Med. Biol. Res., 32(5):619-631, 1999; Morelli et al., Gen. Virol., 80:571-83, 1999) y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., Science, 234:1372-1378, 1986).

En una realización específica, la expresión de una proteína de fusión está regulada por un promotor constitutivo. En otra realización, la expresión de una proteína de fusión está regulada por un promotor inducible. Según estas realizaciones, el promotor puede ser un promotor específico de tejido.

En una realización específica, se usa un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica proteína de fusión, uno o más orígenes de replicación, y, opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de proteína de fusión puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359, 1984). Señales de iniciación específicas también pueden requerirse para la eficiente traducción de secuencias codificantes de proteína de fusión insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bitter et al., Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987).

Pueden identificarse vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica una proteína de fusión por tres enfoques generales: (a) hibridación de ácidos nucleicos, (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador", y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica una

proteína de fusión en un vector de expresión puede detectarse por la hibridación de ácidos nucleicos usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica la proteína de fusión. En el segundo enfoque, el sistema de vector recombinante/hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, actividad de timidina cinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de inclusión en baculovirus, etc.) producidas por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión se inserta dentro de la secuencia del gen marcador del vector, recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de proteína de fusión pueden identificarse por la ausencia de la función de gen marcador. En el tercer enfoque, pueden identificarse vectores de expresión recombinantes ensayando el producto génico (por ejemplo, proteína de fusión) expresado por el recombinante. Tales ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína de fusión en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, unión con anticuerpo anti-molécula bioactiva.

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. La expresión de ciertos promotores puede ser elevada en presencia de ciertos inductores; así, puede controlarse la expresión de la proteína de fusión genéticamente manipulada. Además, diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y post-traduccional y modificación (por ejemplo, glucosilación, fosforilación de proteínas). Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o sistemas de hospedador para garantizar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano producirá un producto no glucosilado y la expresión en levadura producirá un producto glucosilado. Pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y en particular, líneas celulares neuronales tales como, por ejemplo, neuroblastomas humanos SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ (Sugimoto et al., J. Natl. Cancer Inst., 73: 51-57, 1984), neuroblastoma humano SK-N-SH (Biochim. Biophys. Acta, 704: 450-460, 1982), meduloblastoma cerebeloso humano de Daoy (He et al., Cancer Res., 52: 1144-1148, 1992), células de glioblastoma DBTRG-05MG (Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol., 28A:609-614, 1992), neuroblastoma humano IMR-32 (Cancer Res., 30: 2110-2118, 1970), astrocitoma humano 1321N1 (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74: 4816, 1997), astrocitoma humano MOG-G-CCM (Br. J. Cancer, 49: 269, 1984), glioblastoma-astrocitoma humano U87MG (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 74: 465-486, 1968), glioblastoma humano A172 (Olopade et al., Cancer Res., 52: 2523-2529, 1992), células de glioma de rata C6 (Benda et al., Science, 161: 370-371, 1968), neuroblastoma de ratón Neuro-2a (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65: 129-136, 1970), neuroblastoma de ratón NB41A3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 1184-1190, 1962), plexo coroideo de ovejas SCP (Bolin et al., J. Virol. Methods, 48: 211-221, 1994), G355-5, astrocito normal de gato PG-4 (Haapala et al., J. Virol., 53: 827-833, 1985), cerebro de hurón Mpf (Trowbridge et al., In vitro, 18: 952-960, 1982), y líneas celulares normales tales como, por ejemplo, cerebro de corteza normal de rata CTX TNA2 (Radany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6467-6471, 1992) tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/hospedador pueden efectuar reacciones de procesamiento a diferentes grados.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente la proteína de fusión. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y entonces se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan la proteína génica diferencialmente expresada o de vía. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que afectan la actividad endógena de la proteína génica diferencialmente expresada o de vía.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler, et al., Cell, 11:223, 1997), hipoxantinaganina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, et al., 1980, Célula, 22:817, 1980) pueden emplearse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para genes dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980; O'Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, et al., Gene, 30:147, 1984).

Una vez se ha producido una proteína de fusión de la invención por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A,

y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

5.5. Usos profilácticos y terapéuticos de anticuerpos

La presente invención engloba terapias basadas en anticuerpo que implican administrar anticuerpos a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección. Compuestos profilácticos y terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos. Los anticuerpos pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Anticuerpos de la presente invención que actúan de antagonistas de una enfermedad, trastorno o infección pueden administrarse a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad, trastorno o infección. Por ejemplo, pueden administrarse anticuerpos que rompen o previenen la interacción entre un antígeno viral y su receptor de célula hospedadora a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a una infección viral.

En una realización específica, un anticuerpo o fragmento del mismo previene que un antígeno viral o bacteriano se una a su receptor de célula hospedadora 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 unión del antígeno a su receptor de célula hospedadora en ausencia de dichos anticuerpos. En otra realización, una combinación de anticuerpos previene que un antígeno viral o bacteriano se una a su receptor de célula hospedadora 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 unión del antígeno a su receptor de célula hospedadora en ausencia de dichos anticuerpos. En una realización preferida, el anticuerpo se usa para tratar o prevenir infección por VRS.

También pueden administrarse anticuerpos que no previenen que un antígeno viral o bacteriano se una a su receptor de célula hospedadora, pero inhiben o regulan por disminución la replicación viral o bacteriana, a un animal para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a una infección viral o bacteriana. La capacidad de un anticuerpo para inhibir o regular por disminución la replicación viral o bacteriana puede determinarse por técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. Por ejemplo, la inhibición o regulación por disminución de la replicación viral puede determinarse detectando el título viral en el animal.

En una realización específica, un anticuerpo inhibe o regula por disminución la replicación viral o bacteriana 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 %, o al menos el 10 % con respecto a la replicación viral o bacteriana en ausencia de dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos inhibe o regula por disminución la replicación viral o bacteriana 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 replicación viral o bacteriana en ausencia de dichos anticuerpos.

También pueden usarse anticuerpos para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas. En una realización específica, un anticuerpo inhibe o reduce el crecimiento o metástasis de células cancerosas 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 al crecimiento o metástasis en ausencia de dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos inhibe o reduce el crecimiento o metástasis de cáncer 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 al crecimiento o metástasis en ausencia de dicho anticuerpos. Ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, leucemia (por ejemplo, leucemia aguda tal como leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda), neoplasias, tumores (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular,

carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma), enfermedad de las cadenas pesadas, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular incontrolado.

También pueden usarse anticuerpos para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, un anticuerpo reduce la inflamación en un animal 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 con dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos reducen the inflamación en un animal por al menos 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 no administrado con dichos anticuerpos. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, espondiloartropatías, enfermedad inflamatoria del intestino y asma.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo usado para el tratamiento de inflamación (o cáncer) es un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$ modificado, preferentemente un anticuerpo Vitaxin (véase, publicaciones PCT WO 98/33919 y WO 00/78815, ambas por Huse et al.).

También pueden usarse anticuerpos para prevenir el rechazo de trasplantes. También pueden usarse anticuerpos para prevenir la formación de coágulos. Además, también puede administrarse anticuerpos que actúan como agonistas de la respuesta inmunitaria a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad, trastorno o infección.

Pueden usarse uno o más anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a uno o más antígenos localmente o por vía sistémica en el cuerpo como agente terapéutico. Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizados en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hepatopoyéticos (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 los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizados en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hepatopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizados en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección, tal como, por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales. Ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecán, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal y taxol. Ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, citocinas (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), inhibidores de transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, 3TC, D4T, ddC, ddl, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdina, nevirapina, abacavir, y otros didesoxinucleósidos o didesoxifluoronucleósidos), inhibidores de la terminación de ARNm viral, tales como ribavirina, inhibidores de proteasas tales como inhibidores de la proteasa del VIH (por ejemplo, amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir), anfotericina B, castanospermina como un inhibidor del procesamiento de glucoproteínas, inhibidores de neuraminidasa tales como inhibidores de neuraminidasa del virus de la gripe (por ejemplo, zanamivir y oseltamivir), inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecinas y análogos de las mismas), amantadina y rimantadina. Ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos tales como inhibidores de COX-2 (por ejemplo, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, flosulida, y SC-58635, y MK-966), ibuprofeno e indometacina, y esteroides (por ejemplo, deflazacort, dexametasona y metilprednisolona).

En una realización específica, los anticuerpos administrados a un animal son de un origen de especie o reactividad de especie que es la misma especie que la del animal. Así, en una realización preferida, se administran anticuerpos humanos o humanizados, o ácidos nucleicos que codifican ser humano o ser humano, a un paciente humano para terapia o profilaxis.

En realizaciones preferidas, inmunoglobulinas que tienen semividas *in vivo* prolongadas se usan en inmunoterapia pasiva (para tanto terapia como profilaxis). Debido a la semivida prolongada, puede llevarse a cabo inmunoterapia pasiva o profilaxis usando dosis más bajas y/o administración menos frecuente del agente terapéutico que produce menos efectos secundarios, mejor cumplimiento del paciente, terapia/profilaxis menos cara, etc. En una realización preferida, el agente terapéutico/profiláctico es un anticuerpo que se une a VRS, por ejemplo, SYNAGIS® u otro anticuerpo anti-VRS. Tales anticuerpos anti-VRS, y métodos de administración, se desvelan en las solicitudes de patente de EE.UU. N.º de serie 09/724.396 y 09/724.531, ambas tituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-

RSV Antibodies For Prophylaxis and Treatment", ambas por Young et al., ambas presentadas el 28 de noviembre de 2000, y solicitudes de continuación en parte de estas solicitudes, patentes de EE.UU. N.º 2003/0091584 y 2002/0177126, respectivamente, también tituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment", por Young et al. También están incluidos los anticuerpos anti-VRS descritos en la Sección 5.1, arriba. En una realización específica, las proteínas de fusión administradas a un animal son de un origen de especie o reactividad de especie que es la misma especie que la del animal. Así, en una realización preferida, proteínas de fusión o ácidos nucleicos humanos que codifican proteínas de fusión humanas se administran a un sujeto humano para terapia o profilaxis.

5.6. Usos profilácticos y terapéuticos de proteínas de fusión y moléculas conjugadas

La presente invención engloba terapias basadas en proteínas de fusión y basadas en moléculas conjugadas que implican administrar proteínas de fusión o moléculas conjugadas a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección. Los compuestos profilácticos y terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión y ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión y moléculas conjugadas. Pueden proporcionarse proteínas de fusión y moléculas conjugadas en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Pueden administrarse proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención que actúan como antagonistas de una enfermedad, trastorno o infección a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad, trastorno o infección. Además, pueden administrarse proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención que actúan como agonistas de la respuesta inmunitaria a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad, trastorno o infección.

Pueden usarse una o más proteínas de fusión y moléculas conjugadas localmente o por vía sistémica en el cuerpo como agente terapéutico. Las proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizadas en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hepatopoyéticos (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 los anticuerpos. Las proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizadas en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hepatopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar la respuesta inmunitaria. Las proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención también pueden ser ventajosamente utilizadas en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección, tal como, por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales. Ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecán, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal y taxol. Ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, citocinas (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), inhibidores de transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, 3TC, D4T, ddC, ddl, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdina, nevirapina, abacavir, y otros didesoxinucleósidos o didesoxifluoronucleósidos), inhibidores de la terminación de ARNm viral, tales como ribavirina, inhibidores de proteasas tales como inhibidores de la proteasa del VIH (por ejemplo, amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir), anfotericina B, castanospermina como un inhibidor del procesamiento de glucoproteínas, inhibidores de neuraminidasa tales como inhibidores de neuraminidasa del virus de la gripe (por ejemplo, zanamivir y oseltamivir), inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecinas y análogos de las mismas), amantadina y rimantadina. Ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos tales como inhibidores de COX-2 (por ejemplo, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, flosulida, y SC-58635, y MK-966), ibuprofeno e indometacina, y esteroides (por ejemplo, deflazacort, dexametasona y metilprednisolona).

5.7. Administración de anticuerpos o proteínas de fusión

La invención proporciona medicamentos para el tratamiento, la profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección, comprendiendo dicho medicamento un anticuerpo de la invención, o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención. La invención también proporciona medicamentos para el tratamiento, la profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección, comprendiendo dicho medicamento una proteína de fusión o molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o moléculas conjugadas de la invención. En un aspecto preferido, un anticuerpo o proteína de fusión o 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, preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono tal como un mono cinomolgo y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un anticuerpo o proteína de fusión o molécula conjugada de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Métodos de administración de un anticuerpo, una proteína de fusión o molécula conjugada, o composición farmacéutica, incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa, o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de los 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 u local. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 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 N.º WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903. En una realización preferida, un anticuerpo, una proteína de fusión, moléculas conjugadas, o una composición farmacéutica, se administra usando la tecnología de administración de fármacos pulmonares Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

La invención también proporciona que un anticuerpo, una proteína de fusión o molécula conjugada se envase en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada. En una realización, el anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferentemente, el anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un envase herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente 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. El anticuerpo liofilizado, proteína de fusión o molécula conjugada debe almacenarse a entre 2 y 8 °C en su recipiente original y el anticuerpo, proteína de fusión o moléculas conjugadas deben administrarse en el plazo de 12 horas, preferentemente en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas, o en el plazo de 1 hora después de ser reconstituido. En una realización alternativa, un anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada se suministra en forma líquida en un envase herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida del anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada se suministra en un envase herméticamente sellado a al menos 1 mg/ml, más preferentemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, o al menos 25 mg/ml.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse, 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, que incluye membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra un anticuerpo o una proteína de fusión, debe tenerse cuidado de usar materiales a los que no se absorba el anticuerpo o la proteína de fusión.

En otra realización, la composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science*, 249:1527-1533, 1990; Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, véase arriba, pp. 317-327; véase generalmente arriba).

En otra realización más, la composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida para un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos, o una o más proteínas de fusión. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.526.938; publicación PCT WO 91/05548; PCT WO 96/20698; Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology*, 39:179-189, 1996; Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 50:372-397, 1995; Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24:853-854, 1997; y Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24:759-760, 1997. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, arriba; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery*, 88:507, 1980; y Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321:574, 1989). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos o proteínas de fusión (véanse, 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, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61, 1983; véase también Levy et al.,

Science, 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol., 25:351, 1989; Howard et al., J. Neurosurg., 71:105, 1989); patente de EE.UU. N.º 5.679.377; patente de EE.UU. N.º 5.916.597; patente de EE.UU. N.º 5.912.015; patente de EE.UU. N.º 5.989.463; patente de EE.UU. N.º 5.128.326; publicación PCR N.º WO 99/15154; y publicación PCT N.º WO 99/20253). En otra realización más, puede ponerse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la revisión por Langer, Science, 249:1527-1533, 1990).

En una realización específica donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o proteína de fusión, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su anticuerpo o proteína de fusión codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que llegue a ser intracelular, por ejemplo, por uso de un vector retroviral (véase la patente de EE.UU. N.º 4.980.286), o por inyección directa, o por uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en conexión con un péptido de tipo homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1864-1868, 1991), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro de ADN de célula hospedadora para la expresión por recombinación homóloga.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otras farmacopeas generalmente reconocidas para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, completo e incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes posiblemente útiles para los seres humanos tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*), excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluye aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales 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.

También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, 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 de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo, o proteína de fusión o molécula conjugada, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un local tal anestésico como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Generalmente, los componentes de las composiciones de la invención se suministran ya sea por separados o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición va a administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Donde la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico,

acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con cationes tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación dependerá de la vía de administración, la edad del sujeto y la gravedad de la enfermedad, trastorno, o infección, y debe ser decidida según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales (por ejemplo, la rata del algodón o mono cinomolgo).

Para proteínas de fusión, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto oscila de aproximadamente 0,001 a 50 mg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferentemente aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de peso corporal. Para anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto normalmente es 0,1 mg/kg a 200 mg/kg del peso corporal del sujeto. Preferentemente, la dosificación administrada a un sujeto está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto y más preferentemente la dosificación administrada a un sujeto está entre 1 mg/kg y 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosificación dependerá, sin embargo, del grado al que la semivida *in vivo* de la molécula ha sido aumentada. Generalmente, anticuerpos humanos y proteínas de fusión humanas tienen semividas más largas dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de proteínas de fusión de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Así, es frecuentemente posible dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos o proteínas de fusión humanas y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos, proteínas de fusión o moléculas conjugadas pueden reducirse también potenciando la captación y penetración en tejido (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con un anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la invención se administra una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra una vez a la semana, dos veces a la 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 del anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada usada para el tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento particular.

5.7.1. Terapia génica

En una realización específica, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o proteínas de fusión para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o infección, a modo de terapia génica. Terapia génica se refiere a 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 en un efecto terapéutico o profiláctico.

Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la materia según la presente invención. Métodos a modo de ejemplo se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy*, 12:488-505, 1993; Wu y Wu, *Biotherapy*, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596, 1993; Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217, 1993; TIBTECH 11(5):155-215, 1993. Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de 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 hospedador adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácidos nucleicos en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión

intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935, 1989; y Zijlstra et al., Nature, 342:435-438, 1989).

5 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 hospedador adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, operativamente unidos 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 ácidos nucleicos en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada
10 está flanqueada por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión.

La administración de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser o bien directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores que llevan el ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso las células son primero transformadas con los ácidos nucleicos *in vitro*, luego se trasplantan en el sujeto. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.
15

En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede llevarse a cabo por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolas de manera que lleguen a ser intracelulares, por ejemplo, por infección usando vectores retrovirales defectuosos o atenuados, u otros virales (véase la patente de EE.UU. N.º 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o por el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o transfectando agentes, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolas en conexión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolas en conexión con un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987) (que puede usarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la captación y expresión específica de célula, dirigiéndose a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221).
20
25
30

Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de célula hospedadora para la expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935, 1989; y Zijlstra et al., Nature, 342:435-438, 1989).
35

En una realización específica, se usan vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller et al., Meth. Enzymol., 217:581-599, 1993). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para la correcta encapsidación del genoma viral e integración en el ADN de célula hospedadora. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que va a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos en un sujeto. Más detalle sobre los vectores retrovirales puede encontrarse en Boesen et al., Biotherapy, 6:291-302, 1994, que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., J. Clin. Invest., 93:644-651, 1994; Klein et al., Blood 83:1467-1473, 1994; Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy, 4:129-141, 1993; y Grossman y Wilson, Curr. Opin. In Genetics and Devel., 3:110-114, 1993.
40
45

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente epitelios respiratorios donde producen una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células no en división. Kozarsky y Wilson, Current Opinion in Genetics and Development, 3:499-503, 1993, presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994, demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., Science, 252:431-434, 1991; Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155, 1992; Mastrangeli et al., J. Clin. Invest., 91:225-234, 1993; la publicación PCT WO 94/12649; y Wang et al., Gene Therapy, 2:775-783, 1995. En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.
50
55
60

También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para su uso en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Mend., 204:289-300, 1993, y la patente de EE.UU. N.º 5.436.146).

Otro enfoque a la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejido por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Normalmente, el método de
65

transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células se colocan entonces bajo selección para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Aquellas células se administran entonces a un sujeto.

5 En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión de células, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica medida por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en la técnica para la introducción de genes extraños en células (véanse, por ejemplo, Loeffler y Behr, Meth. Enzymol., 217:599-618, 1993; Cohen et al., Meth. Enzymol., 217:618-644, 1993; y Clin. Pharma. Ther., 29:69-92, 1985) y pueden usarse según la presente invención, a condición de que no se rompan las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células de receptor. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto por diversos métodos conocidos en la técnica. Glóbulos sanguíneos recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

Células en las que un ácido nucleico puede introducirse para los fines de terapia génica engloban cualquier tipo de célula disponible deseada, e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células de músculo, hepatocitos; glóbulos sanguíneos tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, como se obtienen de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para terapia génica es autóloga para el sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, se introducen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión en las células de forma que sean expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran entonces *in vivo* para el efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede usarse posiblemente según esta realización de la presente invención (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, Cell, 71:973-985, 1992; Rheinwald, Meth. Cell Bio., 21A:229, 1980; y Pittelkow y Scott, Mayo Clinic Proc., 61:771, 1986).

En una realización específica, el ácido nucleico que va a introducirse para los fines de terapia génica comprende un promotor inducible operativamente unido a la región codificante, de forma que la expresión del ácido nucleico es controlable controlando la presencia o ausencia del inductor apropiado de transcripción.

5.8. Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica o profiláctica

45 Pueden caracterizarse anticuerpos, proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la presente invención en una variedad de formas. En particular, los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para la capacidad para unirse inmunespecíficamente a un antígeno. Un ensayo tal puede realizarse en solución (por ejemplo, Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992), sobre perlas (Lam, Nature, 354:82-84, 1991), sobre chips (Fodor, Nature, 364:555-556, 1993), sobre bacterias (patente de EE.UU. N.º 5.223.409), sobre esporas (patentes de EE.UU. N.º 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 sobre fago (Scott y 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). Anticuerpos que se han identificado por unirse inmunespecíficamente a un antígeno o un fragmento del mismo pueden entonces ensayarse para su especificidad afinidad por el antígeno.

Los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos pueden ensayarse para unión inmunespecífica a un antígeno y reactividad cruzada con otros antígenos por cualquier método conocido en la técnica. Inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunespecífica y reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo algunos. Tales ensayos son rutinarios y muy 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). Inmunoensayos a modo de ejemplo se describen brevemente a continuación (pero no pretenden ser a modo de limitación).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (1 % de NP-40 o Triton X-100, 1 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, 1 % de Trasylol) complementado con inhibidores de proteína fosfatasa y/o proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, 5 incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 40 °C, añadir perlas de proteína A y/o proteína G Sepharose al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 40 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Un experto en la materia estaría informado sobre qué parámetros pueden ser modificados para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el ruido (por ejemplo, aclarando previamente el lisado celular con perlas Sepharose). Para discusión adicional referente a los protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis de transferencia Western generalmente comprende preparar muestras de proteína, electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, 8 %-20 % de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno) y transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con 3 % de BSA o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo, ³²P o ¹²⁵I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia estaría informado sobre qué parámetros pueden ser modificados para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para discusión adicional referente a los protocolos de transferencia Western véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Los ELISA comprenden preparar antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que conjugarse con un compuesto detectable; en su lugar, puede añadirse un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir el pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable tras la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia estaría informado sobre qué parámetros pueden ser modificados para aumentar la señal detectada, además de otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para discusión adicional referente a los ELISA véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo o un antígeno y las velocidades de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación por análisis de Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con un anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

En una realización preferida, se usa el análisis cinético BIAcore para determinar las velocidades de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos a un antígeno. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno de chips con anticuerpos inmovilizados sobre su superficie (véase la sección de ejemplos abajo).

Los anticuerpos de la invención, además de proteínas de fusión y moléculas conjugadas, también pueden ensayarse para su capacidad para inhibir la unión de un antígeno a su receptor de célula hospedadora usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto células que expresan el receptor para un antígeno viral con virus en presencia o ausencia de un anticuerpo y puede medirse la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión del antígeno viral, por ejemplo, por citometría de flujo o un contador de centelleo. El antígeno o el anticuerpo pueden marcarse con un compuesto detectable tal como una marca radiactiva (por ejemplo, ³²P, ³⁵S y ¹²⁵I) o una marca fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficocitrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre el antígeno y su receptor de célula hospedadora. Alternativamente, la capacidad de los anticuerpos para inhibir que un antígeno se una a su receptor puede determinarse en ensayos libres de células. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto virus o un antígeno viral (por ejemplo, glucoproteína F de VRS) en un ensayo libre de células con un

anticuerpo y puede determinarse la capacidad del anticuerpo para inhibir el virus o el antígeno viral que se une a su receptor de célula hospedadora. Preferentemente, el anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido y el antígeno se marca con un compuesto detectable. Alternativamente, el antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido y el anticuerpo se marca con un compuesto detectable. El antígeno puede estar parcialmente o completamente purificado (por ejemplo, parcialmente o completamente libre de otros polipéptidos) o parte de un lisado celular.

Además, el antígeno puede ser una proteína de fusión que comprende el antígeno viral y un dominio tal como glutatiónina-S-transferasa. Alternativamente, un antígeno puede biotinilarse usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL).

Los anticuerpos, proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la invención también pueden ensayarse para su capacidad para inhibir o regular por disminución la replicación viral o bacteriana usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la replicación viral puede ensayarse por un ensayo en placa tal como se describe, por ejemplo, por Johnson et al., *Journal of Infectious Diseases*, 176:1215-1224, 1997. Los anticuerpos, proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la invención de la invención también pueden ensayarse para su capacidad para inhibir o regular por disminución la expresión de polipéptidos virales o bacterianos. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern, y RT-PCR, para medir la expresión de polipéptidos virales o bacterianos. Además, los anticuerpos, proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la invención de la invención pueden ensayarse para su capacidad para prevenir la formación de sincitios.

Los anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas y composiciones de la invención se prueban preferentemente *in vitro*, y entonces *in vivo* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar si la administración de un anticuerpo específico, una proteína de fusión específica, una molécula conjugada específica, o una composición de la presente invención, está indicada o no incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del sujeto se cultiva en cultivo, y se expone a o se administra de otro modo un anticuerpo, una proteína de fusión, molécula conjugada o composición de la presente invención, y se observa el efecto de un anticuerpo, una proteína de fusión, molécula conjugada o una composición tal de la presente invención sobre la muestra de tejido. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos de células implicados en una enfermedad o trastorno, para determinar si un anticuerpo, una proteína de fusión, molécula conjugada o composición de la presente invención tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células. Preferentemente, los anticuerpos, las proteínas de fusión, las moléculas conjugadas o composiciones de la invención también se prueban en ensayos *in vitro* y sistemas de modelo animal antes de la administración a seres humanos.

Pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la presente invención para su uso en terapia para su toxicidad en sistemas de modelo animal adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, vacas, monos y conejos. Para la prueba *in vivo* de la toxicidad de un anticuerpo, puede usarse una proteína de fusión, una molécula conjugada, o una composición, cualquier sistema de modelo animal conocido en la técnica.

Puede demostrarse la eficacia en el tratamiento o la prevención de infección viral detectando la capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención para inhibir la replicación del virus, para inhibir la transmisión o prevenir que el virus se establezca él mismo en su hospedador, o para prevenir, mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados a la infección viral. El tratamiento se considera terapéutico si hay, por ejemplo, una reducción en la carga viral, mejora de uno o más síntomas o una disminución en la mortalidad y/o morbilidad tras la administración de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada, o una composición de la invención. También pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la invención para su capacidad para inhibir la replicación viral o reducir la carga viral en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La eficacia en el tratamiento o la prevención de la infección bacteriana puede demostrarse detectando la capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión o una composición de la invención para inhibir la replicación bacteriana, o para prevenir, mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados a la infección bacteriana. El tratamiento se considera terapéutico si hay, por ejemplo, una reducción en los números bacterianos, mejora de uno o más síntomas o una disminución en la mortalidad y/o morbilidad tras la administración de un anticuerpo, una proteína de fusión o una composición de la invención.

La eficacia en el tratamiento del cáncer puede demostrarse detectando la capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención para inhibir o reducir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas o para mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados al cáncer. El tratamiento se considera terapéutico si hay, por ejemplo, una reducción en el crecimiento o la metástasis de células cancerosas, mejora de uno o más síntomas asociados al cáncer, o una disminución en la mortalidad y/o morbilidad tras la administración de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención.

Los anticuerpos, proteínas de fusión o composiciones de la invención pueden probarse para su capacidad para reducir la formación de tumores en ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

La eficacia en el tratamiento de trastornos inflamatorios puede demostrarse detectando la capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención para reducir o inhibir la inflamación en un animal o para mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados a un trastorno inflamatorio. El tratamiento se considera terapéutico si hay, por ejemplo, una reducción en la inflamación o mejora de uno o más síntomas tras la administración de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención.

Pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la invención *in vitro* e *in vivo* para la capacidad para inducir la expresión de citocinas (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL10, IL-12 e IL-15) y marcadores de activación (por ejemplo, CD28, ICOS y SLAM). Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para medir el nivel de expresión de citocinas y marcadores de activación. Por ejemplo, el nivel de expresión de citocinas puede medirse analizando el nivel de ARN de citocinas por, por ejemplo, RT-PCR y análisis de transferencia Northern, y analizando el nivel de citocinas por, por ejemplo, inmunoprecipitación seguido de análisis de transferencia Western o ELISA.

Pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la invención *in vitro* e *in vivo* para su capacidad para modular la actividad biológica de células inmunitarias, preferentemente células inmunitarias humanas (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos espontáneos). La capacidad de un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada o una composición de la invención para modular la actividad biológica de células inmunitarias puede evaluarse detectando la expresión de antígenos, detectando la proliferación de células inmunitarias, detectando la activación de moléculas de señalización, detectando la función efectora de células inmunitarias, o detectando la diferenciación de células inmunitarias. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para medir estas actividades. Por ejemplo, puede ensayarse la proliferación celular por ensayos de incorporación de ^3H -timidina y cifras de células de azul de tripano. Puede ensayarse la expresión del antígeno, por ejemplo, por inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y análisis de FACS. La activación de moléculas de señalización puede ensayarse, por ejemplo, por ensayos de cinasa y ensayos de desplazamiento electroforético (EMSA).

También pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la invención para su capacidad para aumentar el periodo de supervivencia de animales, preferentemente mamíferos y lo más preferentemente seres humanos, que padecen una enfermedad, trastorno o infección al menos el 25 %, preferentemente al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %. Además, pueden probarse anticuerpos, proteínas de fusión, moléculas conjugadas o composiciones de la invención para su capacidad para reducir el periodo de hospitalización de animales, preferentemente mamíferos y lo más preferentemente seres humanos, que padecen una enfermedad, trastorno o infección al menos el 60 %, preferentemente al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para analizar la función de los anticuerpos o composiciones de la invención *in vivo*.

5.9. Usos de diagnóstico de anticuerpos y proteínas de fusión

Pueden usarse anticuerpos marcados, proteínas de fusión y moléculas conjugadas de la invención para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades, trastornos o infecciones. La invención proporciona la detección o diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección, que comprende: (a) ensayar la expresión de un antígeno en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen inmuno específicamente al antígeno; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normales, por lo que un aumento en el nivel de antígeno ensayado en comparación con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección. La invención también proporciona la detección o diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección, que comprende (a) ensayar la expresión de un antígeno en células o una muestra de tejido de un sujeto usando una o proteínas de fusión o moléculas conjugadas de la invención que se unen al antígeno; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal, por lo que un aumento de antígeno en comparación con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección. Por consiguiente, la proteína de fusión o molécula conjugada comprende una molécula bioactiva tal como un ligando, citocina o factor de crecimiento y la región bisagra-Fc o fragmentos de la misma, en la que la proteína de fusión o molécula conjugada es capaz de unirse a un antígeno que se detecta.

Pueden usarse anticuerpos de la invención para ensayar los niveles de antígeno en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos como se describen en el presente documento o como son conocidos para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, véase Jalcanon et al., J. Cell. Biol., 101:976-985, 1985; Jalcanon et al., J. Cell. Biol., 105:3087-3096, 1987). Otros métodos basados en anticuerpo útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Marcas de ensayo de anticuerpos adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen

5 marcas de enzima, tales como fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹³¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In) y tecnecio (^{99m}Tc); marcas luminiscentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

10 Pueden usarse proteínas de fusión para ensayar los niveles de antígeno en una muestra biológica usando, por ejemplo, SDS-PAGE e inmunoensayos conocidos para aquellos expertos en la materia.

15 Un aspecto de la invención es la detección y el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección en un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado que se une inmunoespecíficamente a un antígeno; b) esperar un intervalo de tiempo tras la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferencialmente en sitios en el sujeto donde el antígeno se expresa (y que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de ruido de fondo); c) determinar el nivel de ruido de fondo; y d)

20 detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de forma que la detección del anticuerpo marcado por encima del nivel de ruido de fondo indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno o infección. Según esta realización, el anticuerpo se marca con un resto de obtención de imágenes que es detectable usando un sistema de obtención de imágenes conocido para un experto en la materia. El nivel de ruido de fondo puede determinarse por diversos métodos que incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar previamente

25 determinado para un sistema particular.

En otra realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión marcada o molécula conjugada que se une a un antígeno o alguna otra molécula; b) esperar un intervalo de tiempo tras la administración para permitir

30 que la proteína de fusión marcada o molécula conjugada se concentre preferencialmente en sitios en el sujeto donde el antígeno u otra molécula se expresa (y que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de ruido de fondo); c) determinar el nivel de ruido de fondo; y d) detectar la proteína de fusión marcada o molécula conjugada en el sujeto, de forma que la detección de proteína de fusión marcada por encima del nivel de ruido de fondo indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno o infección. Según esta realización, la proteína de fusión o molécula conjugada

35 comprende una molécula bioactiva tal como un ligando, citocina o factor de crecimiento y una región bisagra-Fc o un fragmento de la misma, en la que dicha proteína de fusión o molécula conjugada se marca con un resto de obtención de imágenes y es capaz de unirse al antígeno que se detecta.

Se entenderá en la materia que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la

40 cantidad de resto de obtención de imágenes necesaria para producir las imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente oscilará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ^{99m}Tc. El anticuerpo marcado se acumulará entonces preferencialmente en la localización de células que contiene la proteína específica. La obtención de imágenes de tumores *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments", Capítulo 13 en

45 Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, que incluyen el tipo de marca usada y el modo de administración, el intervalo de tiempo tras la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferencialmente en sitios en el

50 sujeto y que la molécula marcada no unida se elimine al nivel de ruido de fondo es 6 a 48 horas o 6 a 24 horas o 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo tras la administración es 5 a 20 días o 5 a 10 días.

En una realización, el monitorizar una enfermedad, trastorno o infección se lleva a cabo repitiendo el método de diagnóstico de la enfermedad, trastorno o infección, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses

55 después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para cribado *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marca usada. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el método de detección apropiado de una marca particular. Métodos y dispositivos que pueden usarse en

60 los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (TAC), barrido de cuerpo entero tal como tomografía de emisión de positrones (TEP), imagen por resonancia magnética (IRM) y sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., patente de EE.UU. N.º 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de barrido

65

sensible a la fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con una marca paramagnética y se detecta en un paciente usando imagen por resonancia magnética (IRM).

5 5.10 Kits

La invención también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado(s) a tal(es) recipiente(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja la autorización por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada, de la invención, preferentemente en una forma purificada, en uno o más recipientes. En una realización específica, los kits de la presente invención contienen un antígeno sustancialmente aislado como control. Preferentemente, los kits de la presente invención comprenden además un anticuerpo de control, proteína de fusión, o molécula conjugada que no reacciona con el antígeno incluido en el kit. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo, proteína de fusión, o molécula conjugada, a un antígeno (por ejemplo, el anticuerpo, proteína de fusión, o molécula conjugada, puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En realizaciones específicas, el kit puede incluir un antígeno recombinantemente producido o químicamente sintetizado. El antígeno proporcionado en el kit también puede unirse a un soporte sólido. En una realización más específica, los medios de detección del kit anteriormente descrito incluyen un soporte sólido al que el antígeno está unido. Un kit tal también puede incluir un anticuerpo anti-humano marcado con indicador no unido. En esta realización, la unión del anticuerpo al antígeno puede detectarse uniendo dicho anticuerpo marcado con indicador.

30 5.11 Ensayos *in vitro* e *in vivo* para semivida prolongada de fragmentos de bisagra-Fc de IgG modificada

Puede caracterizarse la capacidad de unión de IgG modificadas y moléculas que comprenden un dominio constante de IgG o fragmento de FcRn del mismo a FcRn por diversos ensayos *in vitro*. La publicación PCT WO 97/34631 por Ward desvela diversos métodos en detalle.

Por ejemplo, con el fin de comparar la capacidad de la IgG modificada o fragmentos de la misma para unirse a FcRn con la de IgG no mutada, la IgG modificada o fragmentos de la misma y la IgG no mutada pueden radiomarcarse y hacerse reaccionar con células que expresan FcRn *in vitro*. La radiactividad de las fracciones unidas a la célula puede ser entonces contada y comparada. Las células que expresan FcRn que van a usarse para este ensayo son preferentemente líneas celulares endoteliales que incluyen células endoteliales de capilares pulmonares de ratón (B10, D2.PCE) derivadas de pulmones de ratones B10.DBA/2 y células endoteliales transformadas con SV40 (SVEC) (Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, 1994) derivadas de ratones C3H/HeJ. Sin embargo, también pueden usarse otros tipos de células, tales como bordes de capillo intestinal aislados de ratones lactantes de 10 a 14 días de edad, que expresan número suficiente de FcRn. Alternativamente, también pueden utilizarse células de mamífero que expresan FcRn recombinante de una especie de elección. Después de contar la radiactividad de la fracción unida de IgG modificada o la de no mutada, las moléculas unidas pueden entonces ser extraídas con el detergente, y puede calcularse y compararse el porcentaje de liberación por número unitario de células.

Puede medirse la afinidad de IgG modificadas por FcRn por medición de resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando, por ejemplo, un BIAcore 2000 (BIAcore Inc.) como se ha descrito previamente (Popov et al., Mol. Immunol., 33:493-502, 1996; Karlsson et al., J. Immunol. Methods, 145:229-240, 1991). En este método, moléculas de FcRn se acoplan a un chip sensor de BIAcore (por ejemplo, chip CM5 por Pharmacia) y se mide la unión de IgG modificada a FcRn inmovilizado a un cierto caudal para obtener sensogramas usando el software BIA evaluation 2.1, basándose en los cuales pueden calcularse las velocidades de asociación y disociación de la IgG modificada, dominios constantes, o fragmentos de los mismos, a FcRn.

También pueden medirse afinidades relativas de IgG modificadas o fragmentos de las mismas, y la IgG no mutada, por FcRn por un simple ensayo de unión por competición. Se añade IgG modificada no marcada o IgG no mutada en diferentes cantidades a los pocillos de una placa de 96 pocillos en la que FcRn está inmovilizado. Entonces se añade una cantidad constante de IgG no mutada radiomarcada a cada pocillo. El porcentaje de radiactividad de la fracción unida se representa contra la cantidad de IgG modificada no marcada o IgG no mutada y puede calcularse la afinidad relativa de la bisagra-Fc modificada a partir de la pendiente de la curva.

Además, también pueden medirse afinidades de IgG modificadas o fragmentos de las mismas, y la IgG no mutada, por FcRn por un estudio de saturación y el análisis de Scatchard.

65

Puede medirse la transferencia de IgG modificada o fragmentos de la misma a través de la célula por FcRn por ensayo de transferencia *in vitro* usando IgG radiomarcada o fragmentos de la misma y células que expresan FcRn y comparando la radiactividad de un lado de la monocapa de células con la del otro lado. Alternativamente, tal transferencia puede medirse *in vivo* alimentando ratones lactantes de 10 a 14 días de edad con IgG modificada radiomarcada y contando periódicamente la radiactividad en muestras de sangre que indica la transferencia de la IgG a través del intestino a la circulación (o cualquier otro tejido diana, por ejemplo, los pulmones). Para probar la inhibición dependiente de la dosis de la transferencia de IgG a través del intestino, se administra una mezcla de IgG radiomarcada y no marcada a cierta relación a los ratones y puede medirse periódicamente la radiactividad del plasma (Kim et al., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994).

Puede medirse la semivida de IgG modificada o fragmentos de la misma por estudios farmacocinéticos según el método descrito por Kim et al. (Eur. J. of Immuno. 24:542, 1994). Según este método, se inyecta IgG modificada radiomarcada o fragmentos de la misma por vía intravenosa en ratones y se mide periódicamente su concentración plasmática en función del tiempo, por ejemplo, 3 minutos a 72 horas después de la inyección. La curva de eliminación así obtenida debe ser bifásica, es decir, fase α y fase β . Para la determinación de la semivida *in vivo* de las IgG modificadas o fragmentos de las mismas, se calcula la velocidad de eliminación en la fase β y se compara con la de la IgG no mutada.

6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la producción, aislamiento y caracterización de fragmentos de bisagra-Fc modificados que tienen semividas *in vivo* más largas.

6.1 Construcción de bibliotecas

6.1.1 Reactivos

Todos los productos químicos fueron de calidad analítica. Se compraron enzimas de restricción y enzimas modificadoras de ADN de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Los oligonucleótidos se sintetizaron por MWG Biotech, Inc. (High Point, NC). Se compraron vector de fagémido pCANTAB5E, conjugado anti-marca E-peroxidasa de rábano picante, cepa TG1 de *E. coli*, columnas de proteína A IgG Sepharose 6 Fast Flow y HiTrap de APBiotec, Inc. (Piscataway, NJ). Se obtuvieron el fago auxiliar VCSM13 y el kit Quick change mutagenesis de Stratagene (La Jolla, CA). La cepa CJ236 de *E. coli* se compró de Bio-Rad (Richmond, CA). Se obtuvo el kit BCA Protein Assay Reagent de Pierce (Rockford, IL). Se compró Lipofectamine 2000 de Invitrogen, Inc. (Carlsbad, CA).

6.1.2 Expresión y purificación de FcRn murino y humano

Las secuencias de aminoácidos de FcRn humano y de ratón son SEQ ID NO. 84 y 85, respectivamente (véanse también Firan et al., Intern. Immunol., 13:993-1002, 2001 y Popov et al., Mol. Immunol., 33:521-530, 1996. También se obtuvo FcRn humano tras el aislamiento de ADNc de placenta humana (Clontech, Palo Alto, CA) de los genes para β 2-microglobulina humana (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC) y los codones -23 a 267 de la cadena α humana (Story et al., J. Exp. Med., 180:2377-2381, 1994) usando protocolos de PCR estándar. Se clonaron cadenas ligeras y pesadas junto con su secuencia señal nativa (Kabat et al., 1991, arriba; Story et al., arriba) en bácmidos pFastBac DUAL y pFastBac1, respectivamente, y se produjeron reservas virales en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se infectaron células High-Five a una multiplicidad de infección de 3 con los baculovirus que codifican cadenas α y β 2 usando protocolos comercialmente disponibles (Invitrogen). Se purificó FcRn humano recombinante del siguiente modo: se dializó sobrenadante de células de insecto infectadas en MES 50 mM (ácido 2-N-[morfolino]etanosulfónico) a pH 6,0 y se suministró a una columna Sepharose 6 Fast Flow de 10 ml para IgG humana (APBiotec, Piscataway, NJ). La resina se lavó con 200 ml de MES 50 mM a pH 6,0 y el FcRn se eluyó con Tris-Cl 0,1 M a pH 8,0. El FcRn purificado se dializó contra MES 50 mM a pH 6,0, se congeló rápidamente y se guardó a -70 °C. La pureza de las proteínas se comprobó por SDS-PAGE y HPLC.

6.1.3 Preparación de molde de uracilo de ADNmc que contiene TAA

La construcción de las bibliotecas se basó en una estrategia de mutagénesis dirigida al sitio derivada del método de Kunkel (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382, 1987). Se clonó un gen de bisagra-Fc humana que atraviesa los restos de aminoácidos 226-478 (numeración de Kabat, Kabat et al., 1991, arriba) derivado de IgG1 humana de MEDI-493 (Johnson et al., J. Infect. Disease, 176:1215-1224, 1997), en el vector de fagémido pCANTAB5E como un fragmento Sfil/NotI. Se generaron cuatro bibliotecas introduciendo mutaciones al azar en las posiciones 251, 252, 254, 255, 256 (biblioteca 1), 308, 309, 311, 312, 314 (biblioteca 2), 385, 386, 387, 389 (biblioteca 3) y 428, 433, 434, 436 (biblioteca 4). Brevemente, se generaron cuatro moldes de bisagra-Fc distintos usando PCR por extensión por solapamiento (Ho et al., Gene, 15:51-59, 1989), conteniendo cada uno el codón de terminación TAA en la posición 252 (biblioteca 1), 310 (biblioteca 2), 384 (biblioteca 3) o 429 (biblioteca 4), de manera que solo fagémidos mutagenizados dieran lugar al fago que presenta Fc.

Entonces se preparó cada ADN monocatenario que contiene TAA (TAA-ADNmc) del siguiente modo: se cultivó una única colonia de CJ236 de *E. coli* que aloja uno de los cuatro fagémidos que contienen TAA relevantes en 10 ml de 2 x medio YT complementado con 10 µg/ml de cloranfenicol y 100 µg/ml de ampicilina. A $DO_{600} = 1$, se añadió fago auxiliar VCSM 13 a una concentración final de 10^{10} ufc/ml. Después de 2 horas, el cultivo se transfirió a 500 ml de 2 x medio YT complementado con 0,25 µg/ml de uridina, 10 µg/ml de cloranfenicol, 30 µg/ml de kanamicina, 100 µg/ml de ampicilina y se cultivó durante la noche a 37 °C. El fago se precipitó con PEG6000 usando protocolos convencionales (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Vols. 1-3) y se purificó usando el kit Qiaprep Spin M13 (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Entonces se combinaron 10 a 30 µg de cada molde de TAA-ADNmc que contiene uracilo con 0,6 µg de los siguientes oligonucleótidos fosforilados (regiones al azar subrayadas) en Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,5 en un volumen final de 250 µl:

Biblioteca 1:

5' -CATGTGACCTCAGGSNNNSNNSNNGATSNNSNNGGTGTCCTTGGGTTTT
GGGGGG-3' (SEQ ID NO:120)

Biblioteca 2:

5' -GCACTTGTACTCCTTGCCATTSNCCASNNSNNGTGSNNNSNNGGTGA
GGACGC-3' (SEQ ID NO:121)

Biblioteca 3:

5' -GGTCTTGTAGTTSNNCTSNNSNNSNNATTGCTCTCCC-3' (SEQ ID NO:122)

Biblioteca 4:

5' -GGCTCTTCTGCGTSNNGTGSSNNSNNCAGAGCCTCATGSNNCACGGAGC
ATGAG-3' (SEQ ID NO:123)

donde N = A, C, T o G y S = G o C.

6.1.4 Síntesis de ADN de heterodúplex

Se fosforilaron oligonucleótidos degenerados apropiados en presencia de cinasa de polinucleótido T4 usando el protocolo estándar. Se combinaron diez a 30 µg de molde U de ADNmc y 0,6 µg de oligonucleótido fosforilado en Tris-HCl 50 mM que contenía $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,5, a un volumen final de 250 µl y se incubaron a 90 °C durante 2 minutos, 50 °C durante 3 minutos y 20 °C durante 5 minutos. La síntesis de ADN de heterodúplex se llevó a cabo añadiendo 30 unidades de tanto ADN ligasa T4 como ADN polimerasa T7 en presencia de ATP 0,4 mM, dNTPs 1 mM y DTT 6 mM, y la mezcla se incubó durante 4 horas a 20 °C. Entonces se purificó el ADN de heterodúplex así producido y se desaló usando el kit de purificación de ADN Qiagen Qiaquick (Qiagen, CA).

6.1.5 Electroporación

Se sometieron a electroporación 300 µl de células TG1 de *E. coli* electrocompetentes con 1 a 5 µg del ADN de heterodúplex en un campo de 2,5 kV usando 200 Ω y 25 µF de capacitancia hasta que se logró un tamaño de biblioteca de 1×10^8 (biblioteca 1 y 2) o 1×10^7 (biblioteca 3 y 4). Las células se resuspendieron en 2 ml de medio SOC y el procedimiento se repitió 6 a 10 veces. La diversidad se evaluó por valoración de *E. coli* recombinante. Las células pulsadas se incubaron en 50 ml de medio de SOC durante 30 minutos a 37 °C con agitación, se centrifugaron y se resuspendieron en 500 ml de 2 x YT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 10^{10} ufp/ml de fago auxiliar VCSM 13. El cultivo se incubó durante la noche a 37 °C y las células se sedimentaron por centrifugación. Se expresó el fago en el sobrenadante que expresa la porción de bisagra-Fc mutada sobre su proteína de la cubierta GIII con PEG6000 como se ha descrito previamente (Sambrook et al., 1989, arriba) y se resuspendió en 5 ml de MES 20 mM, pH 6,0.

6.2 Inmunopurificación de la biblioteca

Se inmunopurificaron los fagos usando un enfoque basado en ELISA. Se recubrió una placa de ELISA de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de 0,01 mg/ml de FcRn murino en tampón carbonato sódico, pH 9,0, a 4 °C durante la noche y entonces se bloqueó con 4 % de leche desnatada a 37 °C durante 2 horas. En cada pocillo de la placa recubierta, se dispusieron 100-150 µl de la suspensión de fago (aproximadamente 10^{13} fagos en total) en MES 20 mM, pH 6,0, que contenía 5 % de leche y 0,05 % de Tween 20, y se incubaron a 37 °C durante dos a tres horas con agitación.

Después de la incubación, los pocillos se lavaron con MES 20 mM, pH 6,0, que contenía 0,2 % de Tween 20 y NaCl 0,3 M aproximadamente treinta veces a temperatura ambiente. Los fagos unidos se eluyeron con 100 µl/pocillo de PBS, pH 7,4, a 37 °C durante 30 minutos.

- 5 Entonces se añadieron los fagos eluidos al cultivo de células de *E. coli* de crecimiento exponencial y se llevó a cabo la propagación durante la noche a 37 °C en 250 ml de 2 x YT complementado con 100 µg/ml de ampicilina y 10¹⁰ ufp/ml de fago auxiliar VCSM13. Se recogieron los fagos propagados por centrifugación, seguido de precipitación con PEG y se repitió el proceso de inmunopurificación hasta un total de seis veces.
- 10 Para la biblioteca de fagos que contenía mutaciones en los restos 308-314 (H310 y W313 fijos), se enriquecieron los fagos que expresan la región bisagra-Fc con afinidades más altas por FcRn por cada proceso de inmunopurificación como se muestra en la Tabla IV. Los resultados de inmunopurificación de la biblioteca para las mutaciones en los restos 251-256 (I253 fijo) y los de la biblioteca para las mutaciones en los restos 428-436 (H429, E430, A431, L432, y H435 fijos), se muestran en las Tablas V y VI, respectivamente. Además, los resultados de inmunopurificación de la biblioteca para las mutaciones en los restos 385-389 (E388 fijo) se muestra en la Tabla VII.
- 15

Tabla IV

INMUNOPURIFICACIÓN DE BIBLIOTECA (RESTOS 308-314; H310 Y W313 FIJOS) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn (FcRn MURINO)			
INMUNOPURIFICACIÓN	SALIDA		RELACIÓN DE ENRIQUECIMIENTO
	+ FcRn	- FcRn	
1ª ronda	1,1 x 10 ⁵	0,5 x 10 ⁵	2
2ª ronda	1 x 10 ⁴	0,2 x 10 ⁴	5
3ª ronda	9 x 10 ⁴	0,3 x 10 ⁴	30
4ª ronda	3 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	15

Tabla V

INMUNOPURIFICACIÓN DE BIBLIOTECA (RESTOS 251-256; 1253 FIJO) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
INMUNOPURIFICACIÓN	SALIDA		RELACIÓN DE ENRIQUECIMIENTO
	+ FcRn	- FcRn	
1ª ronda	2,5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	2,5
2ª ronda	6 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	3,0
3ª ronda	8 x 10 ⁵	4 x 10 ⁴	20
4ª ronda	1,2 x 10 ⁶	5 x 10 ⁴	24
5ª ronda	3,0 x 10 ⁶	6 x 10 ⁴	50

20

Tabla VI

INMUNOPURIFICACIÓN DE BIBLIOTECA (RESTOS 428-436; H429, E430, A431, L432 Y H435 FIJOS) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
INMUNOPURIFICACIÓN	SALIDA		RELACIÓN DE ENRIQUECIMIENTO
	+ FcRn	- FcRn	
1ª ronda	2,3 x 10 ⁵	0,9 x 10 ⁵	2,5
2ª ronda	3 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	3
3ª ronda	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	10
4ª ronda	8 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	16

Tabla VII

INMUNOPURIFICACIÓN DE BIBLIOTECA (RESTOS 385-389; E388 FIJO) pCANTAB5E-KUNKEL-muFcRn			
INMUNOPURIFICACIÓN	SALIDA		RELACIÓN DE ENRIQUECIMIENTO
	+ FcRn	- FcRn	
1ª ronda	4,2 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁵	1,1
2ª ronda	5 x 10 ⁴	0,3 x 10 ⁴	17
3ª ronda	3,5 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴	35
4ª ronda	5,5 x 10 ⁵	4 x 10 ⁴	14
5ª ronda	7,5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	15
6ª ronda	2 x 10 ⁶	1 x 10 ⁵	20

25 6.3 Identificación de clones aislados de la inmunopurificación

Después de cada proceso de inmunopurificación, se aislaron los fagos y se secuenciaron los ácidos nucleicos que codificaban los péptidos expresados que se unieron a FcRn por un método de secuenciación estándar tal como por

secuenciación de didesoxinucleótido (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 74:5463-5467, 1977) usando un analizador genómico ABI3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

5 Como resultado de la inmunopurificación, se aislaron dos mutantes de la biblioteca de fagos que contenían mutaciones en los restos 308-314 (H310 y W313 hijos), trece mutantes de la biblioteca para los restos 251-256 (I253 fijo), seis mutantes de la biblioteca para los restos 428-436 (H429, E430, A431, L432 y H435 hijos) y nueve mutantes de la biblioteca para los restos 385-389 (E388 fijo). Los mutantes aislados de las bibliotecas se enumeran en la Tabla VIII.

Tabla VIII

MUTANTES AISLADOS POR INMUNOPURIFICACIÓN		
BIBLIOTECA	MUTANTES*	
251-256	<u>Leu Tyr Ile Thr Arg Glu</u> (SEQ ID NO:90)	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:91)	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Ser</i> (SEQ ID NO:92)	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Arg</i> (SEQ ID NO:93)	
	<i>Leu Tyr Ile Ser Arg Gln</i> (SEQ ID NO:94)	
	<i>Leu Trp Ile Ser Arg Thr</i> (SEQ ID NO:95)	
	Leu Tyr Ile Ser Leu Gln (SEQ ID NO:96)	
	Leu Phe Ile Ser Arg Asp (SEQ ID NO:97)	
	Leu Phe Ile Ser Arg Thr (SEQ ID NO:98)	
	Leu Phe Ile Ser Arg Arg (SEQ ID NO:99)	
	Leu Phe Ile Thr Gly Ala (SEQ ID NO:100)	
	Leu Ser Ile Ser Arg Glu (SEQ ID NO:101)	
	Arg Thr Ile Ser Ile Ser (SEQ ID NO:102)	
	308-314	<u>Thr Pro His Ser Asp Trp Leu</u> (SEQ ID NO:103)
		<u>Ile Pro His Glu Asp Trp Leu</u> (SEQ ID NO:104)
	385-389	<u>Arg Thr Arg Glu Pro</u> (SEQ ID NO:105)
<i>Asp Pro Pro Glu Ser</i> (SEQ ID NO:106)		
<i>Ser Asp Pro Glu Pro</i> (SEQ ID NO:107)		
<i>Thr Ser His Glu Asn</i> (SEQ ID NO:108)		
<i>Ser Lys Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:109)		
<i>His Arg Ser Glu Asn</i> (SEQ ID NO:110)		
<i>Lys Ile Arg Glu Asn</i> (SEQ ID NO:111)		
<i>Gly Ile Thr Glu Ser</i> (SEQ ID NO:112)		
<i>Ser Met Ala Glu Pro</i> (SEQ ID NO:113)		
428-436		<u>Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His</u> (SEQ ID NO:114)
	<u>Met His Glu Ala Leu His Phe His His</u> (SEQ ID NO: 15)	
	<u>Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His</u> (SEQ ID NO: 116)	
	<u>Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg</u> (SEQ ID NO: 117)	
	<u>Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr</u> (SEQ ID NO:118)	
	<u>Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr</u> (SEQ ID NO: 119)	

* Los restos de sustitución se indican en negrita

10 Las secuencias subrayadas en la Tabla VIII se corresponden con secuencias que ocurrieron 10 a 20 veces en la ronda final de inmunopurificación y las secuencias en cursiva se corresponden con secuencias que ocurrieron 2 a 5 veces en la ronda final de inmunopurificación. Aquellas secuencias que ni están subrayadas ni en cursiva ocurrieron una vez en la ronda final de inmunopurificación.

15 6.4 Expresión y purificación de la región bisagra-Fc de mutantes soluble

Se escinden los genes que codifican fragmentos bisagra-Fc mutados con enzimas de restricción apropiadas y se reclonan en un vector de expresión, por ejemplo, VβpelBhis (Ward, J. Mol. Biol., 224:885-890, 1992). Pueden usarse vectores que contienen cualquier otro tipo de secuencia de marca, tal como marca *c-myc*, marca de decapeptido (Huse et al., Science, 246:1275-1281, 1989), marcas Flag™ (Immunex). Se cultivan clones recombinantes, tales como *E. coli*, y se inducen para expresar fragmentos bisagra-Fc solubles, que pueden aislarse de los medios de cultivo o lisado celular después de choque osmótico, basándose en la marca usada, o por cualquier otro método de purificación muy conocido para aquellos expertos en la materia y caracterizado por los métodos que se enumeran a continuación.

25 6.5 Construcción, producción y purificación de variantes de IgG1

30 Se incorporaron mutaciones Fc representativas tales como I253A, M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H y N434F/Y436 en la IgG1 humana MEDI-493 (SYNAGIS®) (Johnson et al., 1997, arriba). La

cadena pesada se sometió a mutagénesis dirigida al sitio usando el kit Quick Change Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante y las secuencias se verificaron por secuenciación de didesoxinucleótido usando un secuenciador ABI3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se expresaron las diferentes construcciones transitoriamente en células de riñón embrionario humano 293 usando un promotor inmediato-temprano del CMV y operón dicistrónico en el que IgG1/V_H se co-secreta con IgG1/V_L (Johnson et al., 1997, arriba). Se llevó a cabo transfección usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y protocolos convencionales. Se purificaron las IgG de los medios acondicionados directamente en columnas de proteína A HiTrap de 1 ml según las instrucciones del fabricante (APBiotech).

6.6 Caracterización de la región bisagra-Fc mutada

6.6.1 Caracterización *in vitro* en HPLC y SDS-PAGE

Tras la purificación, características generales tales como peso molecular y características de unión de los fragmentos bisagra-Fc modificados pueden ser estudiadas por diversos métodos muy conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen SDS-PAGE y HPLC.

Ensayo de unión de FcRn

Pueden medirse la actividad de unión de fragmentos bisagra-Fc modificados incubando bisagra-Fc no mutante radiomarcada o bisagra-Fc modificada con las células que expresan ya sea FcRn de ratón o humano. Normalmente, se usan líneas celulares endoteliales tales como células endoteliales transformadas con SV40 (SVEC) (Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, 1994). Después de la incubación con los fragmentos de bisagra-Fc a 37 °C durante 16-18 horas, las células se lavan con medio y luego se desprenden por incubación con Na₂EDTA 5 mM en tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, durante 5 minutos. Se mide la radiactividad por 10⁷ células.

Entonces, las células se resuspenden en 2 ml de 2,5 mg/ml de CHAPS, Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0 que contiene 0,3 mg/ml de PMSF, 25 mg/ml de pepstatina y 0,1 mg/ml de aprotinina y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se centrifuga la suspensión de células y se separa el sobrenadante. Se mide la radiactividad del sobrenadante y se usa para calcular la cantidad de los fragmentos de bisagra-Fc extraídos por 10⁷ células.

La K_d para la interacción de IgG1 humana no mutante con FcRn murino y humano (269 y 2527 nM, respectivamente) concuerda bien con los valores determinados por otros (265 y 2350 nM, respectivamente, Firan et al., 2001, arriba).

La mutación I253A prácticamente suprime la unión a FcRn humano y murino, como se informó por otros (Kim et al., Eur. J. Immunol., 29:2819-2825, 1991; Shields et al., J. Biol. Chem., 276:6591-6604, 2001). Esto no es el resultado de plegamiento erróneo del anticuerpo, ya que este mutante retiene la misma actividad específica que la molécula no mutada (SYNAGIS[®]) en un ensayo de microneutralización (Johnson et al., 1997, arriba; datos no mostrados).

Se generaron mutantes de IgG1 humana con elevada afinidad de unión hacia tanto FcRn murino como humano (Tabla VIII). Las mejoras en la estabilidad de complejos estuvieron en general menos marcadas para el par IgG1 humana-FcRn humano que para IgG1 humana-FcRn murino en comparación con IgG1 no mutada fueron 30-($\Delta\Delta G = 2,0$ kcal/mol para N434F/Y436H) y 11-($\Delta\Delta G = 1,4$ kcal/mol para M252Y/S254T/T256E) veces, respectivamente. Sin embargo, la clasificación de las posiciones más críticas sigue siendo invariable cuando se comparan FcRn humano y murino: el mayor aumento en la estabilidad del complejo IgG1-FcRn murino ($\Delta\Delta G > 1,3$ kcal/mol) ocurrió en mutaciones en las posiciones 252, 254, 256 (M252Y/S254T/T256E y M252W) y 433, 434, 436 (H433K/N434F/Y436H y N434F/Y436H). Asimismo, se encontró que las mismas mutaciones tenían el impacto más profundo sobre la interacción de IgG1-FcRn humano y también produjeron el mayor aumento en la estabilidad del complejo ($\Delta\Delta G > 1,0$ kcal/mol). Sustituciones en las posiciones 308, 309, 311, 385, 386, 387 y 389 tuvieron poco o ningún efecto sobre la estabilidad de los complejos que implican a FcRn humano o murino ($\Delta\Delta G < 0,5$ kcal/mol). Restos en el centro del sitio de combinación de Fc-FcRn contribuyen significativamente más a la mejora en la estabilidad del complejo que los restos en la periferia (FIG. 9).

La eficiente unión de Fc humana a FcRn murino requiere aparentemente la presencia de varios restos de Fc no mutados. Por ejemplo, la leucina está muy conservada en 251, arginina en 255, ácido aspártico en 310, leucina en 314 y metionina en 428 (FIG. 6). Se observa otra tendencia de especificidad cuando se consideran las posiciones 308, 309 y 311 donde treonina, prolina y serina, respectivamente, están muy fuertemente favorecidas con respecto a los restos no mutados correspondientes (FIG. 6). Sin embargo, la generación de estas secuencias consenso fuertes no se correlaciona con la magnitud de aumento en la afinidad ya que V308T/L309P/Q311S se une menos de 2 veces mejor que la IgG1 no mutada a tanto FcRn humano como murino (Tabla IX).

Aumentos en la afinidad pueden ser fuertemente dependientes de la sustitución de restos en una posición de 'punto caliente'. Por ejemplo, la mutación individual M252Y produce un aumento en la unión a FcRn murino de 9 veces, mientras que mutaciones adicionales aportan poco (M252Y/S254T/T256E) o ningún (M252Y/T256Q) beneficio añadido. Se observa la misma tendencia para el receptor humano, aunque a un menor grado. De hecho,

M252Y/S254T/T256E muestra una mejora marcada de 2,5 veces en la afinidad en comparación con M252Y. Esto probablemente refleja las diferencias entre el sitio de unión de FcRn humano y murino (West y Bjorkman, Biochemistry, 39:9698-9708, 2000).

- 5 Mutantes de IgG1 derivados de fago que presentan un aumento significativo en la afinidad hacia FcRn murino ($\Delta\Delta G > 1,3$ kcal/mol) también mostraron actividad de unión significativa al receptor a pH 7,2 cuando se comparó con IgG1 no mutada (FIG. 8A-H). Mutantes de IgG1 con aumento moderado en la afinidad ($\Delta\Delta G < 0,3$ kcal/mol) se unen muy poco a pH 7,2 (datos no mostrados). A diferencia, mutantes de IgG1 con gran aumento ($\Delta\Delta G > 1,0$ kcal/mol) en la afinidad hacia FcRn humano presentaron solo unión mínima a pH 7,4 cuando se compara con IgG1 no mutada (FIG. 8A-H).

10

Tabla IX

CONSTANTES DE DISOCIACIÓN Y CAMBIOS DE ENERGÍA LIBRE RELATIVA PARA LA UNIÓN DE MUTANTES DE IgG1/FC A FcRn MURINO Y HUMANO *				
MUTANTE	Constante de disociación Fc/ FcRn murino (nM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Constante de disociación Fc/FcRn humano (mM)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
No mutado	269 ± 1		2527 ± 117	
I253A	NB	NA	NB	NA
M252Y/S254T/T256E	27 ± 6	1,4	225 ± 10	1,4
M252W	30 ± 1	1,3	408 ± 24	1,1
M252Y	41 ± 7	1,1	532 ± 37	0,9
M252Y/T256Q	39 ± 8	1,1	560 ± 102	0,9
M252F/T256D	52 ± 9	1,0	933 ± 170	0,6
V308T/L309P/Q311S	153 ± 23	0,3	1964 ± 84	0,1
G385D/Q386P/N389S	187 ± 10	0,2	2164 ± 331	0,1
G385R/Q386T/P387R/N389P	147 ± 24	0,4	1620 ± 61	0,3
H433K/N434F/Y436H	14 ± 2	1,8	399 ± 47	1,1
N434F/Y436H	9 ± 1	2,0	493 ± 7	1,0

*Las mediciones de afinidad se llevaron a cabo por BIAcore como se ha descrito anteriormente. La numeración de restos es según EU (Kabat et al., 1991, arriba). Las diferencias en los cambios de energía libre se calculan como las diferencias entre las ΔG de reacciones de no mutados y mutantes ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{no mutado}} - \Delta G_{\text{mutante}}$). NB, Sin unión. NA, no aplicable.

Ensayo transferencia mediada por FcRn

- 15 Este ensayo sigue el protocolo desvelado en la publicación PCT WO 97/34631. Se añaden fragmentos bisagra-Fc modificados radiomarcados a diversa concentración (1 µg/ml-1 mg/ml) en un lado de transwell y la transferencia de los fragmentos mediada por monocapa que expresa FcRn de las células puede ser cuantificada midiendo la radiactividad en el otro lado de transwell.

20 6.6.2 Estudio farmacocinético *in vivo*

Con el fin de determinar la semivida de bisagra-Fc de IgG modificada, se radiomarcaban fragmentos de bisagra-Fc modificados con ²⁵¹I (actividad específica aproximada de 10⁷ cpm/µg) y se disuelven en solución salina (pH 7,2). La solución se inyecta por vía intravenosa en ratones BALB/c (Harlan, Indianápolis, IN), que han sido previamente administrados con agua que contiene Nal para bloquear la tiroides, en un volumen no superior a 150 µl y con una radiactividad de 10 x 10⁶-50 x 10⁶ cpm. Los ratones se sangran en el seno retro-orbital en diversos momentos de tiempo, por ejemplo, 3 minutos a 72 horas después de la inyección, en tubos capilares heparinizados y se cuenta el plasma recogido de cada muestra para radiactividad.

- 30 Para generar los datos proporcionados en la FIG. 10, se usaron 10 animales para cada molécula ensayada con 2,5 µg de anticuerpo inyectado por animal. Se determinaron los niveles en suero de anticuerpo usando un ELISA de IgG anti-humana (FIG. 10). Parece que hay una correlación inversa entre la afinidad por FcRn de ratón y la persistencia en suero. Esto podría ser debido a la cantidad significativa de unión de los mutantes observada a pH 7,2, que conduce al secuestro (es decir, ausencia de liberación en el suero) de las moléculas. Datos preliminares (no mostrados) sugieren un aumento del transporte de los mutantes al pulmón. Además, como los mutantes presentan niveles más bajos de unión a FcRn humano que a FcRn murino (véanse las FIG. 8A-H), se espera que los niveles en suero de anticuerpo sean más altos en primates y seres humanos.

40 6.6.3 Análisis de resonancia de plasmones superficiales

Se monitorizó la interacción de FcRn murino y humano soluble con variantes de IgG1 humana inmovilizada por detección de resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento BIAcore 3000 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suecia). No se detectó material agregado que pudiera interferir con las mediciones de afinidad (van der Merwe et al., EMBO J., 12:4945-4954, 1993; van der Merwe et al., Biochemistry 33:10149-10160, 1994) por filtración

en gel. Se calcularon las concentraciones de proteína por el método del ácido bicinónico (BCA) para tanto FcRn humano como murino o usando el 1 % de coeficiente de extinción a 280 nm de 1,5 para IgG1 no mutada y variantes.

Las últimas se acoplaron a la matriz de dextrano de un chip sensor CM5 (Pharmacia Biosensor) usando un kit de acoplamiento de amina como se ha descrito (Johnson et al., arriba). Las concentraciones de proteína oscilaron de 3-5 $\mu\text{g/ml}$ en acetato sódico 10 mM, pH 5,0. El periodo de activación se estableció durante 7 minutos a un caudal de 10 $\mu\text{l/min}$ y el periodo de inmovilización se estableció a entre 10 y 20 minutos a un caudal de 10 $\mu\text{l/min}$. Los ésteres reactivos en exceso se inactivaron mediante inyección de 70 μl de 1,0 clorhidrato de metanolamina, pH 8,5. Esto produjo normalmente la inmovilización de entre 500 y 4000 unidades de resonancia (UR). FcRn humano y murino se intercambiaron de tampón contra tampón PBS 50 mM a pH 6,0 que contenía 0,05 % de Tween 20. Se hicieron diluciones en el mismo tampón. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C con concentraciones que oscilaban de 120 a 1 $\mu\text{g/ml}$ a un caudal de 5 a 10 $\mu\text{l/min}$; los datos se recogieron durante 25 a 50 minutos y se usaron tres pulsos de 1 minuto de tampón PBS a pH 7,2 para regenerar las superficies. También se hizo circular FcRn sobre una celda no recubierta y los sensogramas de estas series de blanco se restaron de aquellos obtenidos con chips acoplados a IgG1. Las series se analizaron usando el software BIAevaluation 3.1 (Pharmacia). Se determinaron constantes de asociación (K_A) del análisis de Scatchard midiendo la concentración de reactantes libres y complejo en equilibrio después de la corrección para unión no específica. En experimentos BIAcore de unión en equilibrio (Karlsson et al., 1991, arriba; van der Merwe et al., 1993, arriba; van der Merwe et al., 1994, arriba; Raghavan et al., *Immunity*, 1:303-315, 1994; Malchiodi et al., *J. Exp. Med.*, 182:1833-1845, 1995), la concentración del complejo puede evaluarse directamente como la respuesta en estado estacionario. La concentración de analito libre (FcRn humano o murino) es igual a la concentración de analito a granel ya que el analito es constantemente repuesto durante la inyección de muestra. La concentración de ligando libre sobre la superficie del chip sensor puede derivarse de la concentración del complejo y de la capacidad de unión total de la superficie como $K_A = R_{\text{eq}}/C(R_{\text{máx}} - R_{\text{eq}})$ donde C es la concentración de analito libre, R_{eq} es la respuesta en estado estacionario y $R_{\text{máx}}$ es la capacidad de unión de superficie total. Reordenando, la ecuación reza: $R_{\text{eq}}/C = K_A R_{\text{máx}} - K_A R_{\text{eq}}$.

Una representación de R_{eq}/C frente a R_{eq} a diferentes concentraciones de analito da así una línea recta de la que puede calcularse K_A (véase la Tabla IX). Se estimaron errores como la desviación estándar para dos o tres determinaciones independientes y fueron <20 %.

Se introdujeron mutaciones representativas identificadas después de la inmunopurificación de las bibliotecas 1 a 4 (FIG. 6, Tabla VIII) en la porción Fc de una IgG1 humana. La inyección de diferentes concentraciones de FcRn humano o murino sobre las variantes de IgG1 inmovilizadas dieron unión dependiente de la concentración. Perfiles de resonancia típicos para la unión en equilibrio del mutante M252Y/S254T/T256E a FcRn murino y humano se muestran en las FIG. 7A y B. Para estimar K_A aparentes, se usaron concentraciones de FcRn que oscilaban de 120 a 1 $\mu\text{g/ml}$. En todos los casos, se alcanzaron niveles de unión en equilibrio (o cerca del equilibrio) en el plazo de 50 minutos. Para estimar el aumento en la UR resultante del efecto no específico de la proteína sobre el índice de refracción a granel, se midió la unión de FcRn a una célula no recubierta y se restaron los sensogramas de estas series en blanco de aquellos obtenidos con chips acoplados a IgG1. Las representaciones de Scatchard para la unión del mutante M252Y/S254T/T256E a FcRn murino y humano se muestran en las FIG. 7C y D. Las representaciones fueron todas lineales, y se calcularon K_A aparentes a partir de las pendientes relevantes. Se llevaron a cabo mediciones por duplicado o triplicado y se confirmó que las IgG inmovilizadas retuvieron su actividad de unión original.

Como hay dos sitios de unión no equivalentes sobre la IgG1 de ratón por FcRn murino con afinidades de < 130 nM y 6 μM (Sanchez et al., *Biochemistry*, 38:9471-9476, 1999; Schuck et al., *Mol. Immunol.*, 36:1117-1125, 1999; Ghetie y Ward, *Ann. Rev. Immunol.*, 18:739-766, 2000), el receptor se usó en disolución para evitar los efectos de avididad que surgen cuando IgG1 se une a FcRn inmovilizado. De acuerdo con esto, se observan afinidades sistemáticamente más altas cuando FcRn, en vez de IgG, se inmoviliza sobre el chip biosensor (Popov et al., 1996, arriba; Vaughn y Bjorkman, *Biochemistry*, 36:9374-9380, 1997; Martin y Bjorkman, *Biochemistry*, 38:12639-12647; West y Bjorkman, *Biochemistry*, 39:9698-9708, 2000). Bajo las condiciones de BIAcore experimentales de los presentes inventores, se miden principalmente interacciones correspondientes a la asociación de afinidad más alta (es decir, ligando-receptor único), según la linealidad de las representaciones de Scatchard (FIG. 7C y D).

También se usó análisis de BIAcore para comparar la afinidad de IgG1 no mutada y mutantes de IgG1. Mutantes de IgG1 derivados de fago que presentaron un aumento significativo en la afinidad hacia FcRn murino a pH 6,0 ($\Delta\Delta G \geq 1,0$ kcal/mol) también mostraron unión significativa al receptor de ratón a pH 7,2 con señal de $\text{SPR}_{\text{pH}7,4}$ /señales de $\text{SPR}_{\text{pH}6,0} > 0,6$ a saturación. Los mutantes de IgG1 con aumento moderado en la afinidad hacia FcRn murino a pH 6,0 ($\Delta\Delta G < 0,4$ kcal/mol) se unieron muy poco al receptor de ratón a pH 7,2. A diferencia, mutantes de IgG1 que presentaron gran aumento de afinidad hacia FcRn humano a pH 6,0 ($\Delta\Delta G \geq 1,0$ kcal/mol) solo mostraron unión mínima al receptor humano a pH 7,4 con señal de $\text{SPR}_{\text{pH}7,4}$ /señal de $\text{SPR}_{\text{pH}6,0} < 0,15$ a saturación.

1. Una IgG modificada que comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto al dominio constante de IgG no mutada, en la que la IgG modificada tiene una elevada semivida en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG no mutada,

y en al que la una o más modificaciones de aminoácidos son en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-435.

5 2. Una IgG no humana modificada que comprende un dominio constante de IgG no humana que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG no humana no mutada, en la que la IgG modificada tiene una elevada semivida en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG no humana no mutada, y en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, con la condición de que la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyan sustitución con leucina en la posición 252, serina en la posición 10 254 y fenilalanina en la posición 256.

15 3. Una IgG humana o humanizada modificada que comprende un dominio constante de IgG humana que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG humana no mutada, en la que la IgG humana o humanizada modificada tiene una elevada semivida en comparación con la semivida de una IgG humana o humanizada que tiene el dominio constante de IgG humana no mutada, y en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436.

20 4. La IgG modificada según la cláusula 1, 2 o 3, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos.

5. La IgG modificada según la cláusula 1, 2 o 3, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una delección de aminoácidos.

25 6. La IgG modificada según la cláusula 1, 2 o 3, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una inserción de aminoácidos.

30 7. La IgG modificada según la cláusula 1, 2 o 3 que tiene una mayor afinidad por FcRn que la IgG que tiene el dominio constante de IgG no mutada.

8. La IgG modificada según la cláusula 7 que tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4.

35 9. La IgG modificada según la cláusula 1, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 255, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 436.

40 10. La IgG modificada según la cláusula 2 o 3, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 336.

45 11. La IgG modificada según la cláusula 1 o 3, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina o serina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o treonina en la posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.

50 12. La IgG modificada según la cláusula 11, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.

55 13. La IgG modificada según la cláusula 11, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.

60 14. La IgG modificada según la cláusula 11, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con tirosina o triptófano en la posición 252.

65 15. La IgG modificada según la cláusula 2, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385,

sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o treonina en la posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.

5 16. La IgG modificada según la cláusula 15, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustitución con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.

17. La IgG modificada según la cláusula 15, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustitución con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.

10 18. La IgG modificada según la cláusula 15, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con tirosina o triptófano en la posición 252.

15 19. La IgG modificada según la cláusula 3 o 15 que tiene el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera de SYNAGIS®.

20 20. La IgG modificada según la cláusula 3 o 15 que tiene el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera de AFFF, p12f2, p12f4, p11d4, Ale109, A12a6, A13c4, A17d4, A4B4, A8C7, 1X-493L1FR, H3-3F4, M3H9, Y10H6, DG, AFFF(1), 6H8, L1-7E5, L215B10, A13A11, A1H5, A4B4(1), A4B4L1FR-S28R o A4B4-F52S.

25 21. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido no de IgG ligado covalentemente a un dominio constante de IgG modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de IgG modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto al dominio constante de IgG no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, y en la que dicha proteína de fusión tiene una semivida más larga que el polipéptido no de IgG solo.

30 22. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido no de IgG ligado covalentemente a un dominio constante de IgG no humana modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de IgG no humana modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG no humana no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, con la condición de que la secuencia de aminoácidos modificada no tenga leucina en la posición 252, serina en la posición 254 y fenilalanina en la posición 256, y en la que dicha proteína de fusión tiene una semivida más larga que el polipéptido no de IgG solo.

35 23. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido no de IgG ligado covalentemente a un dominio constante de IgG humana modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de IgG humana modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG humana no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, y en la que dicha proteína de fusión tiene una semivida más larga que el polipéptido no de IgG solo.

40 24. La proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos.

45 25. La proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una delección de aminoácidos.

50 26. La proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una inserción de aminoácidos.

55 27. La proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23, en la que el dominio constante de IgG modificada o fragmento tiene una elevada afinidad por FcRn con respecto al dominio constante de IgG no mutada.

28. La proteína de fusión según la cláusula 27, en la que el dominio constante de IgG modificada o fragmento tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4.

60 29. La proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23, en la que el polipéptido no de IgG es una inmunoglobulina.

65 30. La proteína de fusión según la cláusula 21, en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 255, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 436.

31. La proteína de fusión según la cláusula 22 o 23, en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 336.
- 5 32. La proteína de fusión según la cláusula 21 o 23, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina o serina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 10 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o 15 treonina en la posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.
33. La proteína de fusión según la cláusula 32, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.
- 20 34. La proteína de fusión según la cláusula 32, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.
35. La proteína de fusión según la cláusula 32, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con 25 tirosina o triptófano en la posición 252.
36. La proteína de fusión según la cláusula 32, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, 30 arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o treonina en la 35 posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.
37. La proteína de fusión según la cláusula 36, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.
- 40 38. La proteína de fusión según la cláusula 36, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.
39. La proteína de fusión según la cláusula 36, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con 45 tirosina o triptófano en la posición 252.
40. Una molécula que comprende un agente no de proteína conjugado con un dominio constante de IgG modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de IgG 50 modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto al dominio constante de IgG no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, y en la que dicha molécula tiene una semivida más larga que el agente no de proteína solo.
41. Una molécula que comprende un agente no de proteína conjugado con un dominio constante de IgG no humana modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de 55 IgG no humana modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG no humana no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, con la condición de que la secuencia de aminoácidos modificada no tenga leucina en la posición 252, serina en la posición 254 y fenilalanina en la posición 256, y en la que dicha molécula tiene una semivida más larga que el agente no de proteína solo.
- 60 42. Una molécula que comprende un agente no de proteína conjugado con un dominio constante de IgG humana modificada, o un fragmento del mismo que se une a FcRn, comprendiendo dicho dominio constante de IgG humana modificada o fragmento una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante 65 de IgG humana no mutada, en la que la una o más modificaciones son en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, y en la que dicha molécula tiene una semivida más larga que el agente no de proteína solo.

43. La molécula según la cláusula 40, 41 o 42, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos.
- 5 44. La molécula según la cláusula 40, 41 o 42, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una delección de aminoácidos.
45. La molécula según la cláusula 40, 41 o 42, en la que al menos una de las modificaciones de aminoácidos es una inserción de aminoácidos.
- 10 46. La molécula según la cláusula 40, 41 o 42, en la que el dominio constante de IgG modificada o fragmento tiene una elevada afinidad por FcRn con respecto al dominio constante no mutado.
- 15 47. La molécula según la cláusula 46, en la que el dominio constante de IgG modificada o fragmento tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4.
48. La molécula según la cláusula 40, en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251, 255, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 436.
- 20 49. La molécula según la cláusula 41 o 42, en la que la una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución en una o más de las posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 314, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 o 336.
- 25 50. La molécula según la cláusula 40 o 42, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina o serina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o treonina en la posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.
- 30 51. La molécula según la cláusula 50, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.
- 35 52. La molécula según la cláusula 50, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.
- 40 53. La molécula según la cláusula 50, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con tirosina o triptófano en la posición 252.
- 45 54. La molécula según la cláusula 41, en la que dicha una o más modificaciones de aminoácidos son sustitución con leucina en la posición 251, sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, sustitución con treonina en la posición 254, sustitución con arginina en la posición 255, sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, sustitución con prolina en la posición 309, sustitución con serina en la posición 311, sustitución con aspartato en la posición 312, sustitución con leucina en la posición 314, sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, sustitución con treonina o prolina en la posición 386, sustitución con arginina o prolina en la posición 387, sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, sustitución con metionina o treonina en la posición 428, sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433, o sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436.
- 50 55. La molécula según la cláusula 54, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con tirosina en la posición 252, treonina en la posición 254 y glutamato a 256.
- 55 56. La molécula según la cláusula 54, en la que dicha una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones con lisina en la posición 433, fenilalanina en la posición 434 e histidina en la posición 436.
- 60 57. La molécula según la cláusula 54, en la que dicha sustitución de aminoácidos es una sustitución con tirosina o triptófano en la posición 252.
- 65 58. Una composición farmacéutica que comprende la IgG humana o humanizada modificada según la reivindicación 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

59. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión según la reivindicación 23 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 60. Una composición farmacéutica que comprende la molécula según la reivindicación 42 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
61. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la IgG humana o humanizada modificada según la reivindicación 3.
- 10 62. El método según la cláusula 61 que comprende inmunoterapia pasiva.
63. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión según la reivindicación 23.
- 15 64. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula según la reivindicación 42.
65. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio constante de IgG modificada según la cláusula 1, 2 o 3, o un fragmento de unión a FcRn del mismo.
- 20 66. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión según la cláusula 21, 22 o 23.
- 25 67. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la cláusula 65.
68. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la cláusula 66.
69. Un kit que comprende la IgG humana o humanizada modificada según 3.
- 30 70. Un kit que comprende la proteína de fusión según la cláusula 23.
71. Un kit que comprende la molécula según la cláusula 42.
- 35 72. Un método de prevención de una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un sujeto una cantidad profilácticamente eficaz de la IgG humana o humanizada modificada según 3.
73. El método según la cláusula 72 que es inmunoterapia pasiva.
- 40 74. El método según la cláusula 72 en el que la enfermedad es infección por VRS.
75. El método según la cláusula 74, en el que dicha IgG humana o humanizada modificada es un anticuerpo SYNAGIS[®] modificado.
- 45 76. El método según la cláusula 74, en el que dicha IgG humana o humanizada modificada es un anticuerpo AFFF, p12f2, p12f4, p11d4, Ale109, A12a6, A13c4, A17d4, A4B4, A8C7, 1X-493L1FR, H3-3F4, M3H9, Y10H6, DG, AFFF(1), 6H8, L1-7E5, L215B10, A13A11, A1H5, A4B4(1), A4B4L1FR-S28R o A4B4-F52S modificado.
- 50 77. Un método de vacunación de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad de la IgG humana o humanizada modificada según la reivindicación 3 eficaz para provocar una respuesta inmunitaria.
78. Un método vacunación de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad de la proteína de fusión según la cláusula 23 eficaz para provocar una respuesta inmunitaria.
- 55 79. El método según la cláusula 61 que comprende administrar una dosis de dicha IgG humana o humanizada modificada que es inferior a la dosis terapéuticamente eficaz más baja de una segunda IgG idéntica a dicha IgG humana o humanizada modificada, excepto que dicha segunda IgG carece de dicha una o más modificaciones de aminoácidos.
- 60 80. El método según la cláusula 79 que produce menos efectos secundarios o menos graves que la administración de la dosis terapéuticamente eficaz de la segunda IgG.
- 65 81. El método según la cláusula 61 que comprende administrar un programa de dosificación terapéuticamente eficaz que tiene dosis menos frecuentes de dicha IgG humana o humanizada modificada que el programa de dosificación terapéuticamente eficaz que tiene la dosificación menos frecuente de una segunda IgG idéntica a

dicha IgG humana o humanizada modificada, excepto que dicha segunda IgG carece de dichas una o más modificaciones de aminoácidos.

5 82. El método según la cláusula 72 que comprende administrar una dosis profilácticamente eficaz de dicha IgG humana o humanizada modificada que es inferior a la dosis profilácticamente eficaz más baja de una segunda IgG idéntica a dicha IgG humana o humanizada modificada, excepto que dicha segunda IgG carece de dicha una o más modificaciones de aminoácidos.

10 83. El método según la cláusula 82 que produce menos efectos secundarios o menos graves que la administración de la dosis profilácticamente eficaz de la segunda IgG.

15 84. El método según la cláusula 72 que comprende administrar un programa de dosificación profilácticamente eficaz que tiene dosis menos frecuentes de dicho IgG humana o humanizada modificada que el programa de dosificación profilácticamente eficaz con la dosificación menos frecuente de una segunda IgG idéntica a dicha IgG humana o humanizada, excepto que dicha segunda IgG carece de dicha una o más modificaciones de aminoácidos.

85. Un método de diagnóstico *in vivo* en un sujeto que comprende:

- 20 (a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de la IgG humana o humanizada modificada según la reivindicación 3 marcada con un marcador detectable, uniéndose dicha IgG humana o humanizada modificada específicamente a un antígeno asociado a una enfermedad o trastorno;
- 25 (b) permitir que la IgG humana o humanizada modificada se concentre en sitios en dicho sujeto donde dicho antígeno se encuentra; y
- (c) detectar dicho marcador detectable,

por el cual la detección de dicho marcador detectable por encima de un nivel de ruido de fondo o estándar indica que el sujeto tiene dicha enfermedad o trastorno.

30 86. La IgG humana o humanizada modificada según la cláusula 3 que se une inmuno específicamente a un antígeno del VRS.

Listado de secuencias

35 <110> MedImmune, LLC Board of Regents, The University of Texas Dall'Acqua, William Johnson, Leslie Ward, Elizabeth Sally

<120> MOLÉCULAS CON SEMIVIDAS PROLONGADAS, COMPOSICIONES Y USOS DE LAS MISMAS

40 <130> PG430912EPB

<140> EP 10010680.6
<141> 27-09-2010

45 <150> EP 01997063.1
<151> 12-12-2001

<150> PCT/US2001/048432
<151> 12-12-2001

50 <150> US 60/254.884
<151> 12-12-2000

55 <150> US 60/238.760
<151> 09-05-2001

<160> 125

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 649 037 T3

<400> 1

Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
1 5

5 <210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

15 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

30 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

40 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 6

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

50 <210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 649 037 T3

<400> 7

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

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

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

15 <400> 8

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VH

10

<400> 9

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

ES 2 649 037 T3

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

10 Thr Ala Gly Met Ser Val Gly
 1 5

15 <210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

10 Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

15 <210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

10 Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15

20 Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

30 Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

ES 2 649 037 T3

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

```

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
                               20                               25                               30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
                               35                               40                               45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50                               55                               60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                               85                               90                               95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
                               100                              105                              110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                               115                              120
  
```

10 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 18

```

Thr Pro Gly Met Ser Val Gly
1                               5
  
```

20 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 19

```

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1                               5                               10                               15
  
```

ES 2 649 037 T3

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 20
 Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL
 15
 <400> 21

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

 Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 20

 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 22

 Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10
 30

 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 649 037 T3

<400> 23

Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser
1 5

5 <210> 24
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Dominio VH

<400> 24

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

15 <210> 25
<211> 16
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

25

ES 2 649 037 T3

<210> 26
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
           20           25           30

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

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
           85           90           95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105
    
```

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 27

15

```

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser
1           5
    
```

<210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 28

ES 2 649 037 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

10 Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

15 <210> 30
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31

10 Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32

20 Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

ES 2 649 037 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 34
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 34

ES 2 649 037 T3

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

5 <210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37

	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Lys	Lys	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp
10	1				5					10					15	

15 <210> 38
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

10

<210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 40

ES 2 649 037 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

10 Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

15 <210> 42
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser
 1 5

10

<210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 44

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

ES 2 649 037 T3

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 45

10

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

15

<210> 46
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Met Tyr Gln Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 47

10 Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 48
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 48

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 50

10 Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser
 1 5

15 <210> 51
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 51

ES 2 649 037 T3

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

5 <210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53

10 Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser
 1 5

15 <210> 54
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL
 20 <400> 54

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 55
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55

5

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

10

ES 2 649 037 T3

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 56
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

<400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 57
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

25 <400> 57

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

ES 2 649 037 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

10 Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser
 1 5

15 <210> 59
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

<400> 59

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 60
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

ES 2 649 037 T3

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 61

Phe Gln Gly Ser Phe Tyr Pro Phe Thr
 1 5

10

<210> 62
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

20

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

25

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser
 1 5

30

ES 2 649 037 T3

<210> 64
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Dominio VL

10

<400> 64

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
           20           25           30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
           85           90           95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105
  
```

15

<210> 65
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

ES 2 649 037 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68

5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Tyr Arg His Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr

10

ES 2 649 037 T3

85

90

95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5
 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

Asp Thr Tyr Arg His Ser Ser
 1 5

10
 <210> 70
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

20
 <210> 71
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 71

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Phe Phe His Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

10 Ser Leu Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 73

20 Asp Thr Phe Phe His Arg Ser
 1 5

25 <210> 74
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 74

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Leu Leu Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 75
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 75

10 Asp Thr Leu Leu Leu Asp Ser
 1 5

15 <210> 76
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 76

ES 2 649 037 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 77

Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser
1 5

10

<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 78

ES 2 649 037 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 79

Asp Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

15 <210> 80
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

20 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

ES 2 649 037 T3

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 82

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

10

<210> 83
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 83

ES 2 649 037 T3

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

ES 2 649 037 T3

<210> 84
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 84

```

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1                               10                      15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20                      25                      30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50                      55                      60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
 65                      70                      75                      80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85                      90                      95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100                     105                     110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115                     120                     125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130                     135                     140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
 145                     150                     155                     160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
 165                     170                     175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
 180                     185                     190
    
```

ES 2 649 037 T3

Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205

Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
 210 215 220

Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
 245 250 255

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
 260 265 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
 275 280 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
 290 295 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
 305 310 315 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365

5

<210> 85
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 85

ES 2 649 037 T3

Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu
20 25 30

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

Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln
50 55 60

ES 2 649 037 T3

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

ES 2 649 037 T3

Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
 325 330 335

Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
 340 345 350

Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

5 <210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 86

10 Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 1 5

15 <210> 87
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 87

20 Leu Met Ile Ser Arg Thr
 1 5

25 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 88

30 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 1 5

35 <210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89

40 Gly Gln Pro Glu Asn
 1 5

40 <210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 649 037 T3

<400> 90

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu

1

5

5 <210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 91

Leu Tyr Ile Ser Arg Thr
1 5

15 <210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 92

20 Leu Tyr Ile Ser Arg Ser
1 5

25 <210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 93

30 Leu Tyr Ile Ser Arg Arg
1 5

35 <210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 94

40 Leu Tyr Ile Ser Arg Gln
1 5

45 <210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 95

Leu Trp Ile Ser Arg Thr
1 5

ES 2 649 037 T3

5
<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 96

Leu Tyr Ile Ser Leu Gln
1 5

10
<210> 97
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 97

Leu Phe Ile Ser Arg Asp
1 5

20
<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 98

Leu Phe Ile Ser Arg Thr
1 5

30
<210> 99
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Leu Phe Ile Ser Arg Arg
1 5

40
<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Leu Phe Ile Thr Gly Ala
1 5

45
<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 101

Leu Ser Ile Ser Arg Glu
1 5

ES 2 649 037 T3

5
<210> 102
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Arg Thr Ile Ser Ile Ser
1 5

10
<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 103

Thr Pro His Ser Asp Trp Leu
1 5

20
<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 104

Ile Pro His Glu Asp Trp Leu
1 5

30
<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Arg Thr Arg Glu Pro
1 5

35

40
<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

Asp Pro Pro Glu Ser
1 5

45

50
<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Ser Asp Pro Glu Pro
1 5

ES 2 649 037 T3

5
 <210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 108

Thr Ser His Glu Asn
 1 5

10
 <210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 109

Ser Lys Ser Glu Asn
 1 5

20
 <210> 110
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 110

His Arg Ser Glu Asn
 1 5

30
 <210> 111
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 111

Lys Ile Arg Glu Asn
 1 5

40
 <210> 112
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 112

Gly Ile Thr Glu Ser
 1 5

45
 <210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 113

Ser Met Ala Glu Pro
 1 5

ES 2 649 037 T3

5
<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Met His Glu Ala Leu Arg Tyr His His
1 5

10
<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 115

Met His Glu Ala Leu His Phe His His
1 5

20
<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 116

Met His Glu Ala Leu Lys Phe His His
1 5

30
<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Met His Glu Ala Leu Ser Tyr His Arg
1 5

40
<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Thr His Glu Ala Leu His Tyr His Thr
1 5

45
<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 119

ES 2 649 037 T3

Met His Glu Ala Leu His Tyr His Tyr
1 5

5 <210> 120
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de oligonucleótidos usada para construir la biblioteca 1

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)
<223> n = A, T, C o G

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n es a, c, g o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n es a, c, g o t

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> n es a, c, g o t

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> n es a, c, g o t

<400> 120
catgtgacct caggsnnsnn snngatsnns nnggtgtcct tgggtttgg gggg 54

40 <210> 121
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia de oligonucleótidos usada para construir la biblioteca 2

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(24)
<223> n = A, T, C o G

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g o t

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n es a, c, g o t

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> n es a, c, g o t

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n es a, c, g o t

15
 <400> 121
 gcactgtac tccttgccat tsnnccasnn sngtgsnns nnggtgagga cgc 53

20
 <210> 122
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos usada para construir la biblioteca 3

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> n = A, T, C o G

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g o t

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g o t

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g o t

50
 <400> 122
 ggtctgtag ttsnctcsn nsnnsnatt gctctccc 38

55
 <210> 123
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> secuencia de oligonucleótidos usada para construir la biblioteca 4

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> n = A, T, C o G

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g o t

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g o t

ES 2 649 037 T3

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n e s a , c , g o t
5

<400> 123
ggctcttctg cgtsnngtgs nnsnncagag cctcatgsnn cacggagcat gag 53

<210> 124
10

<400> 124
000

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15

<400> 125
20

Asp Thr Arg Tyr Leu Ser Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula modificada que comprende una proteína o agente no de proteína y un dominio constante de IgG, en la que el dominio constante de IgG comprende un dominio CH3 humano en el que hay una sustitución de aminoácidos en los restos de aminoácidos 433, 434 y 436, numerados según el índice EU de Kabat, en la que la molécula modificada tiene una elevada semivida en comparación con la semivida de una molécula que comprende la proteína o el agente no de proteína y un dominio constante de IgG correspondiente que comprende un dominio CH3 humano no mutado, y en la que la sustitución en el resto de aminoácido 433 es una sustitución con una lisina, la sustitución en el resto de aminoácido 434 es una sustitución con una fenilalanina y la sustitución en el resto de aminoácido 436 es una sustitución con una histidina.
2. La molécula modificada de la reivindicación 1, en la que el dominio constante de IgG es un dominio constante de IgG humana.
3. La molécula modificada según la reivindicación 2, en la que el dominio constante de IgG humana es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
4. La molécula modificada según la reivindicación 2 o 3, en la que el dominio constante de IgG de la molécula modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos en uno o más de los restos de aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389, 428-432 y 435 con respecto a un dominio constante de IgG humana no mutada.
5. La molécula modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que el dominio constante de IgG de la molécula modificada tiene una mayor afinidad por FcRn que un dominio constante de IgG humana no mutada.
6. La molécula modificada según la reivindicación 5, en la que el dominio constante de IgG de la molécula modificada tiene una mayor afinidad por FcRn que un dominio constante de IgG humana no mutada a pH 6,0 que a pH 7,4.
7. La molécula modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la molécula modificada es una IgG modificada.
8. La molécula modificada según la reivindicación 7, en la que la IgG modificada se une inmuno-específicamente al virus respiratorio sincitial (VRS), HER2, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-8 (IL-8), CD2, CD3, CD4, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD52, CD64, CD80, CD147, ligando CD40 (CD40L), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), molécula de adhesión intracelular 3 (ICAM-3), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_4\beta_7$, antígeno leucocitario humano (HLA), factor del complemento 5 (C5), inmunoglobulina E (IgE), receptor de glucoproteína IIb/IIIa, CA125, antígeno de superficie de células 17-IA, factor VII, epítipo GD3, glucoproteína de la inmunodeficiencia humana 120 (gp120 del VIH), virus de la hepatitis B (HBV) o citomegalovirus (CMV), VLA-4 o integrina β_2 .
9. La molécula modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que
- (a) la molécula modificada es una proteína de fusión que comprende una proteína no de IgG ligada covalentemente al dominio constante de IgG; o
- (b) el agente no de proteína está conjugado con el dominio constante de IgG.
10. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio constante de la molécula modificada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 10.
12. Una molécula modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en:
- (a) tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto; o
- (b) el diagnóstico de una enfermedad o trastorno.
13. Un conjugado de anticuerpo que comprende la molécula modificada según la reivindicación 7 u 8 y una sustancia detectable o un resto terapéutico.
14. Una composición farmacéutica que comprende la molécula modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el conjugado de anticuerpo según la reivindicación 13, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. La molécula modificada de la reivindicación 12, en la que el sujeto es un ser humano.

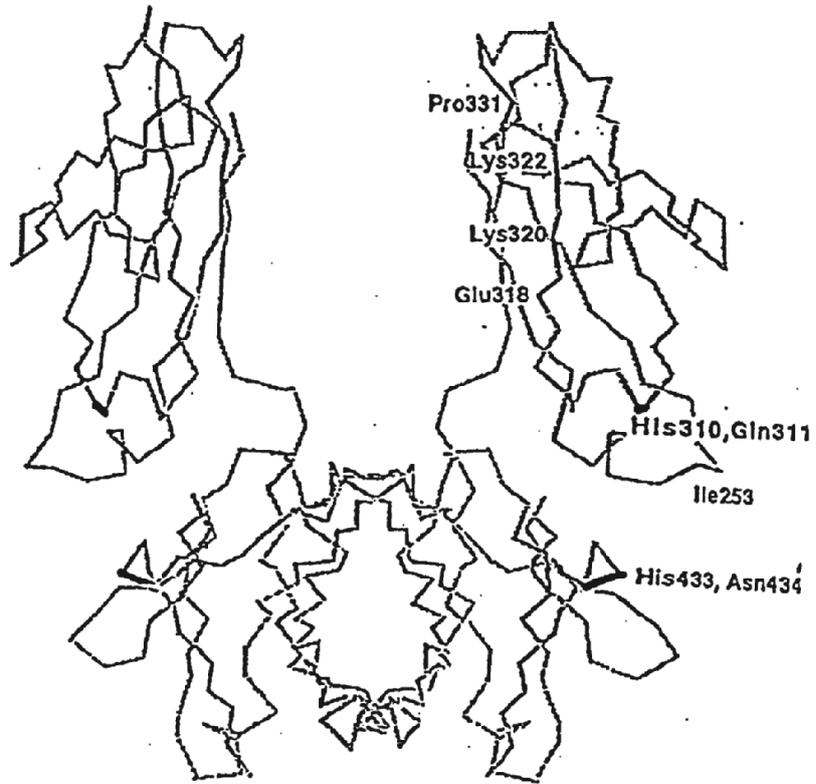


FIG. 1

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1          5          10          15
|-----Hinge-----|
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20          25          30
-----
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35          40          45
-----
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50          55          60
-----CH2-----
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65          70          75          80
-----
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85          90          95
-----
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100         105         110
-----
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115         120         125
-----
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130         135         140
-----
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145         150         155         160
-----CH3-----
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165         170         175
-----
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180         185         190
-----
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195         200         205
-----
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210         215         220
-----
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225         230
-----|

```

FIG. 2

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
20 25 30
His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
35 40 45
Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
50 55 60
Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65 70 75 80
Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
85 90 95
Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
100 105 110
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
115 120 125
Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
130 135 140
Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145 150 155 160
Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
165 170 175
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
180 185 190
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
195 200 205
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
210 215 220
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225 230 235 240
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
245 250 255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
260 265 270
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
275 280 285
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
290 295 300
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
305 310 315 320
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
325 330 335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
340 345 350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
355 360 365

FIG. 3A

Met Gly Met Pro Leu Pro Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15
Pro Gln Thr Trp Gly Ser Glu Thr Arg Pro Pro Leu Met Tyr His Leu
20 25 30
Thr Ala Val Ser Asn Pro Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr
35 40 45
Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Gln
50 55 60
Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp
65 70 75 80
Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Phe
85 90 95
Leu Glu Ala Leu Lys Thr Leu Glu Lys Ile Leu Asn Gly Thr Tyr Thr
100 105 110
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Ser Asp Asn Ser Ser Val
115 120 125
Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Lys Phe Asn
130 135 140
Pro Arg Ile Gly Asn Trp Thr Gly Glu Trp Pro Glu Thr Glu Ile Val
145 150 155 160
Ala Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Asp Ala Ala Arg Lys Glu Ser Glu
165 170 175
Phe Leu Leu Asn Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu Arg
180 185 190
Gly Arg Arg Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
195 200 205
Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala Phe
210 215 220
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225 230 235 240
Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly Ser
245 250 255
Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His His
260 265 270
Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr Val
275 280 285
Asp Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile Val
290 295 300
Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu Leu
305 310 315 320
Trp Gly Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu Ser
325 330 335
Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro Glu
340 345 350
Ala Glu Pro Gln Gly Ala Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
355 360 365

FIG. 3B

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1          5          10          15
|-----Hinge-----|
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20          25          30
-----
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35          40          45
-----
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50          55          60
-----CH2-----
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65          70          75          80
-----
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85          90          95
-----
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100          105          110
-----
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115          120          125
-----
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130          135          140
-----
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145          150          155          160
-----CH3-----
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165          170          175
-----
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180          185          190
-----
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195          200          205
-----
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210          215          220
-----
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225          230
-----

```

FIG. 4

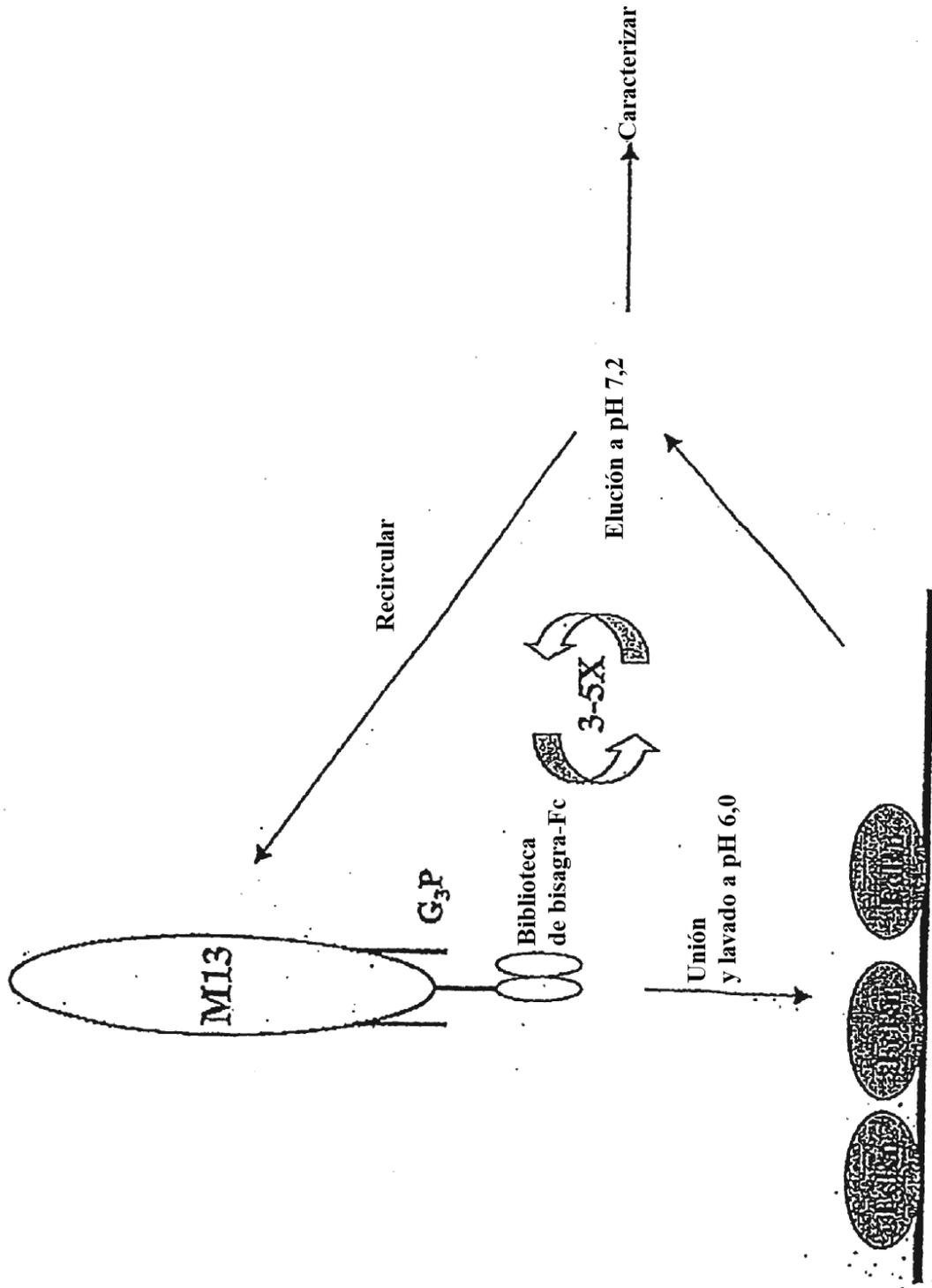


FIG. 5

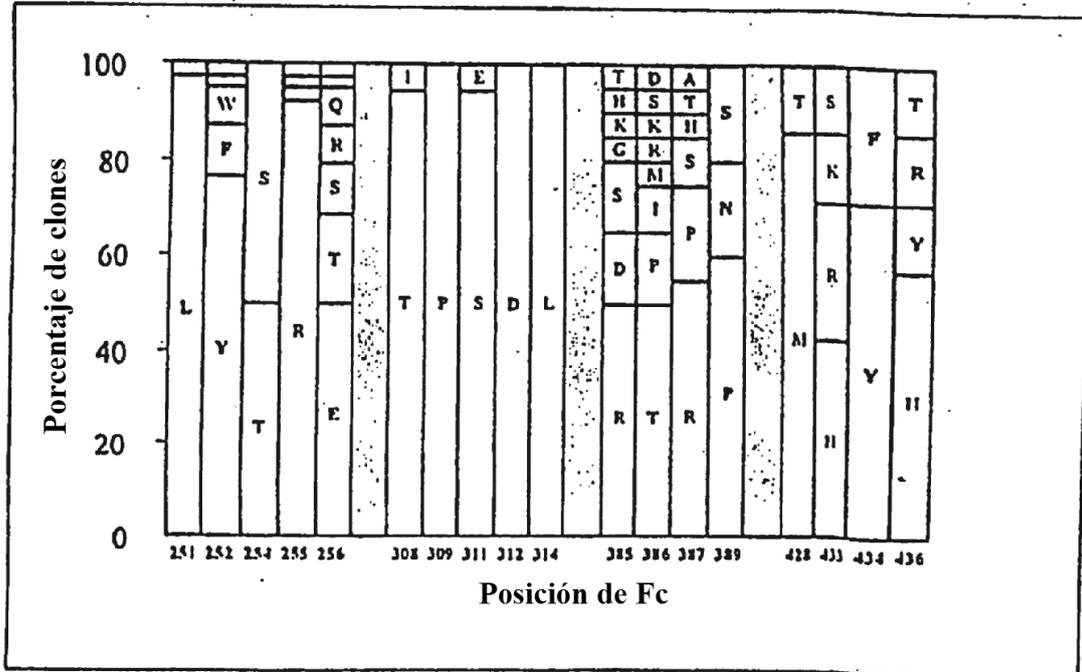


FIG. 6

FIG. 7A

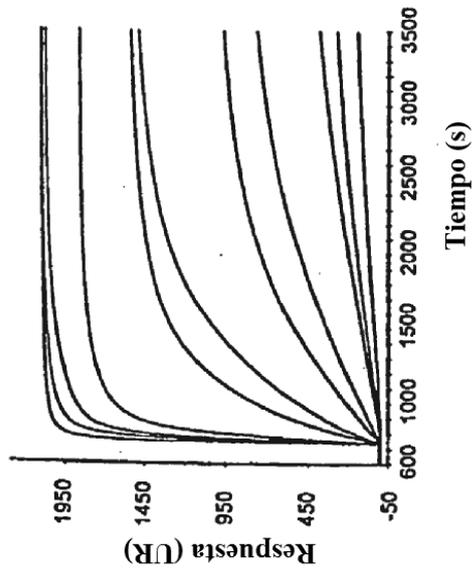


FIG. 7B

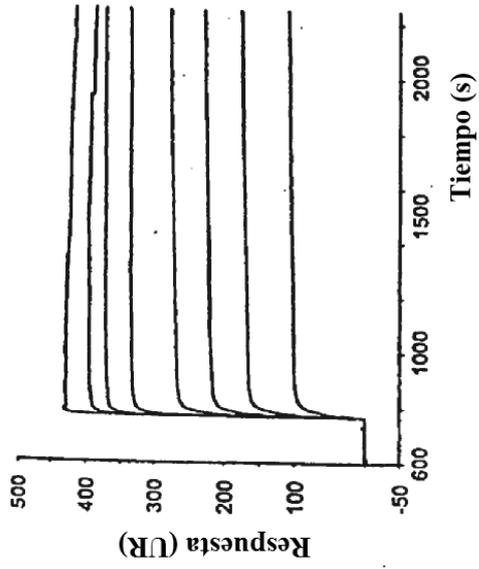


FIG. 7C

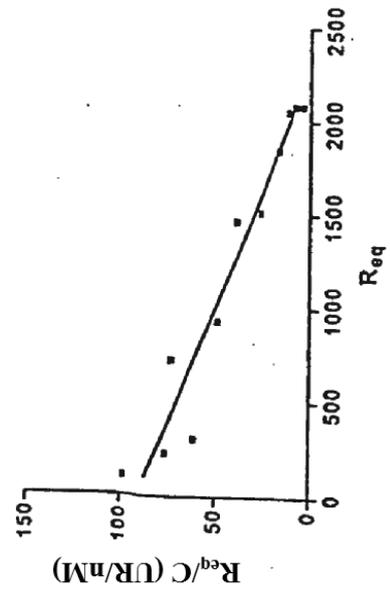
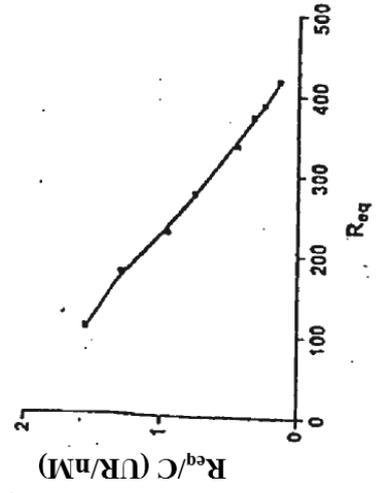
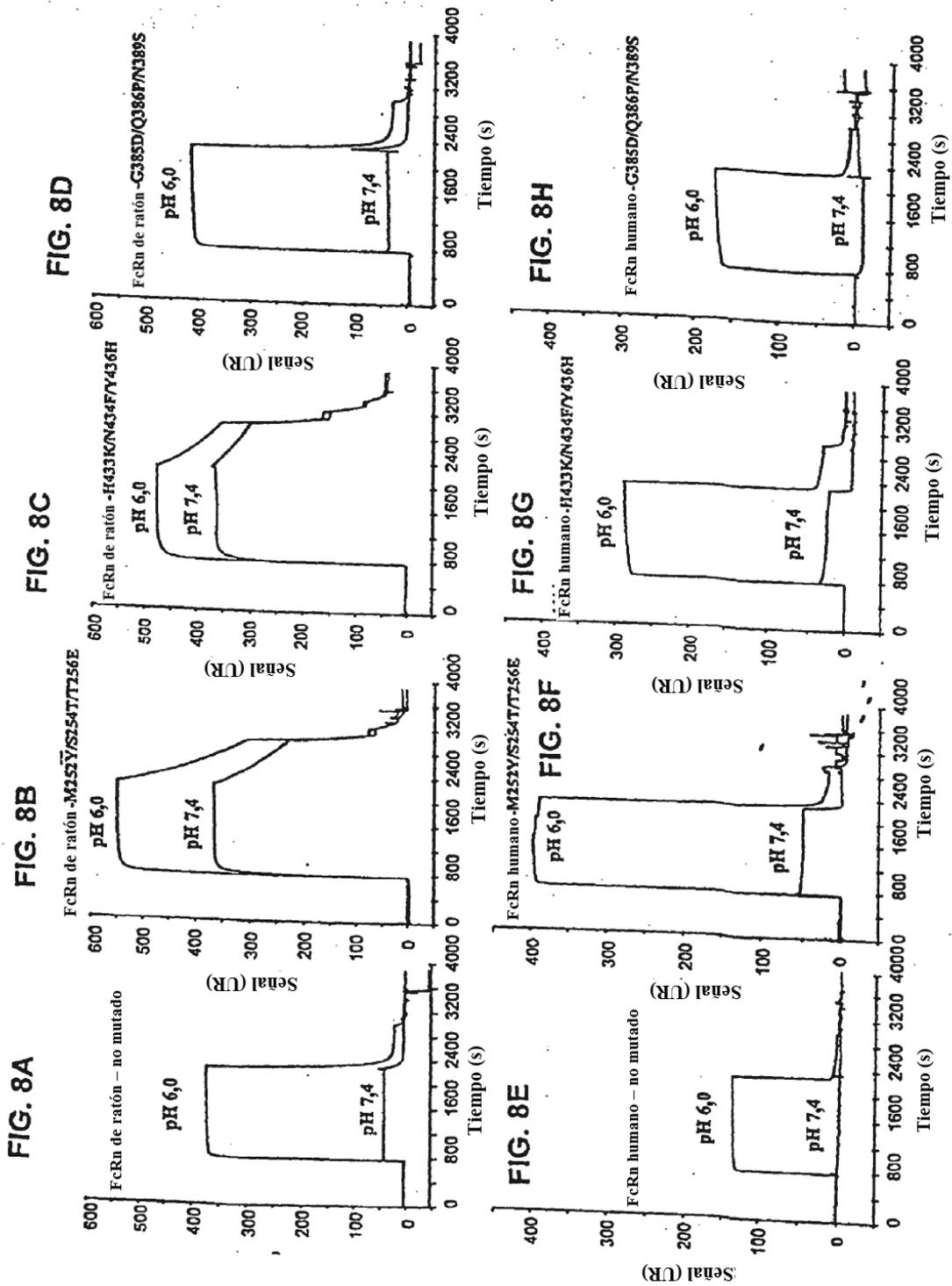


FIG. 7D





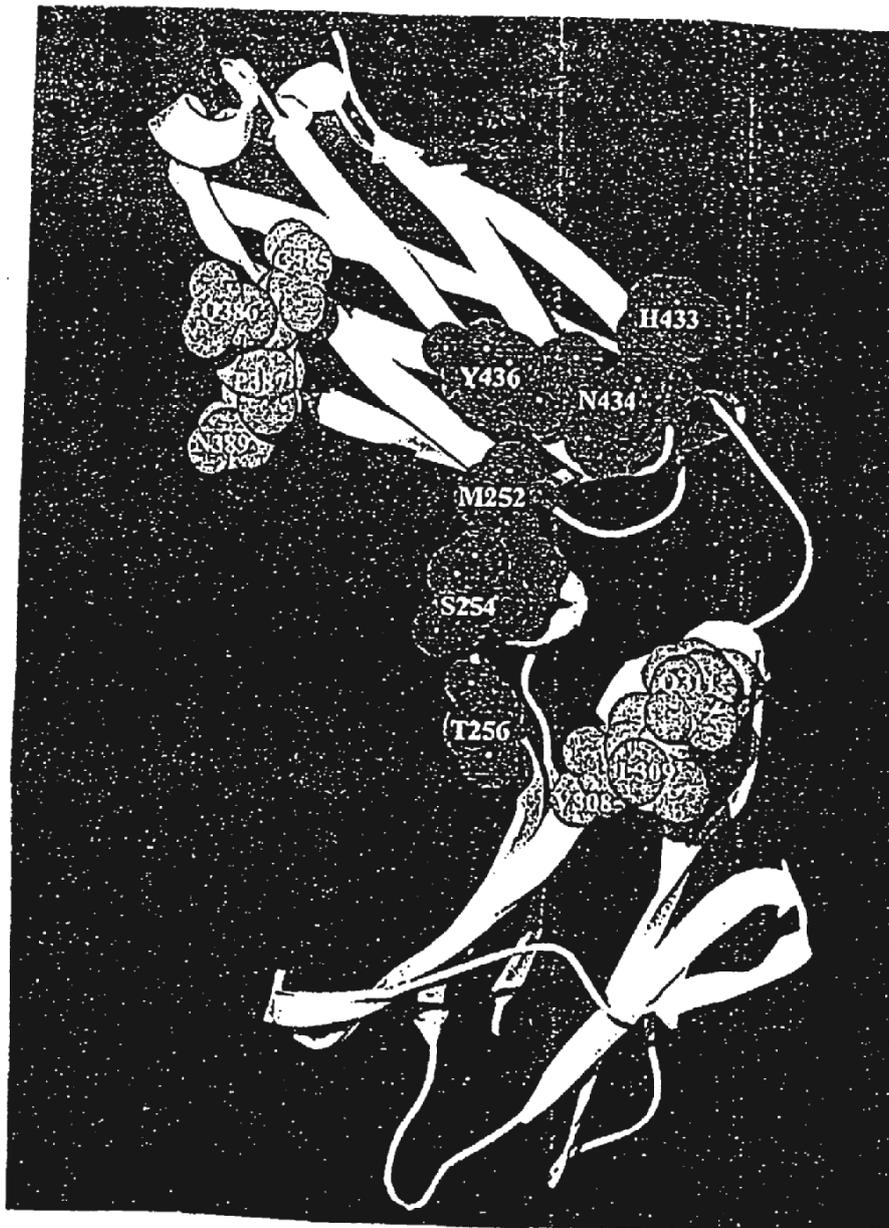


FIG. 9

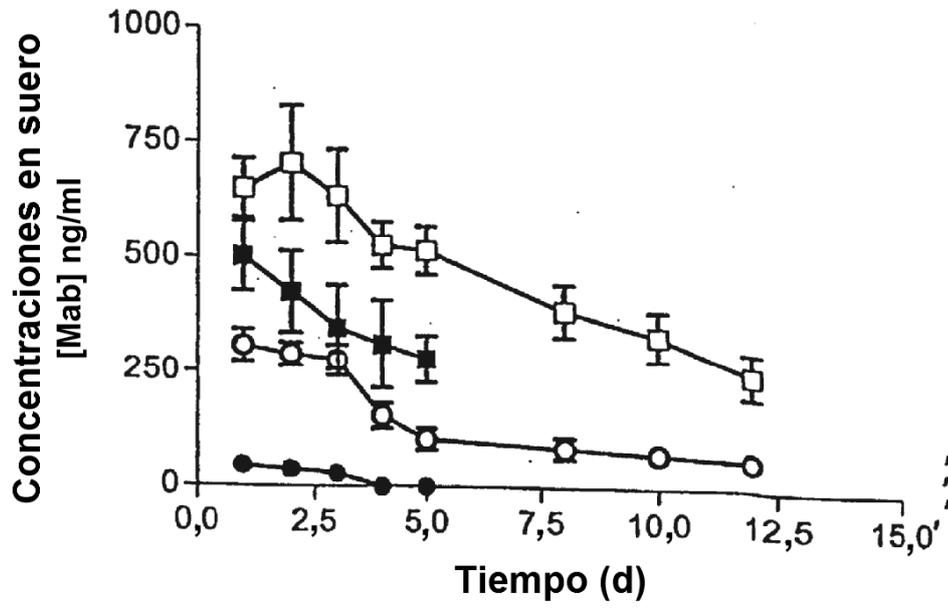


FIG. 10