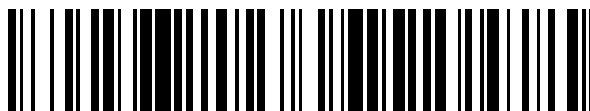


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 730**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2009 PCT/US2009/046214**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10033279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09814929 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2282770**

54 Título: **Anticuerpos con unión alterada a FcRn y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:
04.06.2008 US 58658 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2018

73 Titular/es:
**MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:
GORLATOV, SERGEY

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 675 730 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

Anticuerpos con unión alterada a FcRn y métodos de uso de los mismos

5 **Antecedentes de la invención:**Campo de la invención:

10 La presente invención se refiere a anticuerpos con unión alterada a FcRn y, particularmente, a anticuerpos que tienen unión potenciada a FcRn y/o semividas en suero potenciadas.

Descripción de la técnica relacionada:

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

I. FcRn

25 El FcRn se identificó por primera vez en intestino de ratas neonatales, en las que funciona mediando la absorción del anticuerpo IgG de la leche materna y facilitando su transporte al sistema circulatorio. (Leach et al. (1996) J. Immunology 157:3317). El FcRn también se ha aislado de placenta humana, en la que media la absorción y el transporte de IgG materna a la circulación fetal. En adultos, el FcRn se expresa en el tejido epitelial, tal como las vías respiratorias pulmonares y las superficies nasales (Israel et al. (1997) Immunology 92:69), epitelio intestinal y del túbulo proximal renal (Kobayashi et al. (2002) Renal Physiol. 282: F358), así como las superficies vaginal, colónica, rectal y de las vías biliares. El FcRn es funcionalmente activo en células epiteliales adultas de origen diverso, tal como el epitelio intestinal, bronquial y renal, y puede transportar IgG y sus antígenos unidos a través del epitelio bronquial y la pared intestinal. (Spiekerman et al. (2002) J. Exp. Med. 196(3):303-310; Yoshida et al. (2004) Immunity 20:769-783; Bitonti et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9763-9768). La expresión ubicua del FcRn en células endoteliales sugiere su importancia en la homeostasis de IgG. (Ward et al. (2002) International Immunology 15(2):187; Ghetie et al. (1996) Eur. J. Immunology 26:690).

40 El FcRn puede llevar a cabo estas diversas funciones mediante el transporte y el reciclaje de IgG unida dentro y entre las células. Los anticuerpos normalmente se internalizan de la circulación por las células endoteliales (a través de pinocitosis) y se dirigen a los endosomas ácidos y a los lisosomas de las células para su degradación. El FcRn se puede unir a la región Fc de un anticuerpo al pH ácido de un endosoma (< 6,5), fusionarse con la membrana de la célula endotelial y liberar el anticuerpo al pH neutro del torrente sanguíneo (~ 7,3-7,5), recuperando de esta manera el anticuerpo para un uso posterior. (Junghans y Anderson (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512; Roopenian et al. (2003) J. Immunology 170:3528). Cuando las concentraciones séricas de los anticuerpos disminuyen, hay más moléculas FcRn disponibles para la unión de IgG, de modo que se recupera una mayor cantidad de IgG. Por el contrario, si las concentraciones séricas de IgG aumentan, FcRn se satura, lo que aumenta la proporción de anticuerpos que se internaliza y se degrada (Ghetie y Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:739-66). El transporte transintestinal mediado por FcRn funciona de manera similar, porque el FcRn en el lado luminal del epitelio intestinal se une a IgG a pH ácido (6,0-6,5), transporta IgG a través de la célula hasta la superficie basolateral y libera IgG en el torrente sanguíneo neutro (~ pH 7,3-7,5). (Raghavan et al. (1994) Immunity 1(4):303-15; Raghavan et al. (1995) Biochemistry 34(45):14649-57).

55 El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamíferos, incluidos los seres humanos. Las secuencias del FcRn humano, el FcRn de mono, el FcRn de rata y el FcRn de ratón son conocidas (Story et al. (1994) J. Exp. Med. 180:2377). El FcRn se parece estructuralmente a los polipéptidos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. (Ghetie y Ward (1997) Immunology Today 18 (12):592-8). El FcRn es un heterodímero compuesto de dos cadenas polipeptídicas: una cadena ligera de β_2 microglobulina (β_2m) y una cadena pesada α unida no covalentemente. La cadena β_2m de FcRn es también un componente del MHC I. La cadena α de FcRn es una proteína de 46 kD compuesta de un dominio extracelular dividido en tres subdominios (α_1 , α_2 y α_3), una región transmembranaria y una cola citoplásmica relativamente corta. (Burmeister et al. (1994) Nature 372:336). El FcRn tiene una versión del surco de unión al péptido MHC, pero el surco está ocluido y no funciona en la unión al anticuerpo-FcRn. (Simister y Mostov (1989) Nature 337:184-7).

El FcRn se une a anticuerpos mediante la interacción del dominio extracelular FcRn con sitios en la región Fc de los anticuerpos, particularmente cerca de la superficie de contacto de las regiones CH2 y CH3. (Raghavan et al. (1994) Immunity 1:303-15). El sitio de unión a FcRn de la región Fc es también el sitio en el que se unen las proteínas bacterianas A y G. (Martin et al. (2001) Mol Cell 7:867-877; Sauer-Eriksson et al. (1995) Structure 3:265-278; Tashiro et al. (1995) Curr Opin Struct Biol 5:471-481). Los estudios cristalográficos han confirmado que cada región Fc de una cadena de anticuerpo se puede unir a una molécula de FcRn y, por lo tanto, un anticuerpo IgG completo puede formar complejos con dos moléculas de FcRn a la vez. (Burmeister et al. (1994) Nature 372:336-379).

Diversos experimentos de mutagénesis específica de sitio en la región Fc de IgG de ratón han dado lugar a la identificación de determinados residuos de aminoácido críticos implicados en la interacción entre la IgG y el FcRn. (Kim et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2429-2434; Medesan et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26:2533; Medesan et al. (1997) J. Immunol. 158:2211-2217). Estos estudios y los 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 (todas son numeraciones de Kabat) están altamente conservadas en IgG humanas y de roedor, y que la variación en estos residuos altera la unión de Fc-FcRn y, por tanto, da como resultado anticuerpos con semividas en suero mucho más cortas que la IgG natural. Otros estudios han demostrado que la afinidad de unión aumentada por FcRn da lugar a aumentos en la semivida en suero de la molécula. (Kim et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2429-2434; Popov et al. (1996) Mol. Immunol. 33:493-502; Ghetie et al. (1996) Eur. J. Immunol. 26:690-696; Junghans et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512-55166; Israel et al. (1996) Immunol. 89:573-578).

La función de la afinidad del FcRn que afecta a la semivida en suero es particularmente prometedora para la medicina. Muchos agentes terapéuticos, en particular, productos biológicos (es decir, fármacos peptídicos o polipeptídicos, polinucleótidos, etc.) tienen semividas en suero *in vivo* inadecuadas. Esto requiere la administración de dichos agentes terapéuticos a altas frecuencias y/o dosis más altas, o el uso de formulaciones de liberación sostenida, para mantener las concentraciones séricas necesarias para los efectos terapéuticos. La administración sistémica frecuente de productos terapéuticos, sin embargo, es costosa, inconveniente para el paciente y los médicos, y se asocia con efectos secundarios negativos considerables tales como la cicatrización del tejido, las patologías vasculares y un mayor riesgo de infección. Dichos inconvenientes dan lugar a una disminución del cumplimiento del paciente y un aumento de los costes para el sistema sanitario.

II. Receptores Fcγ

Los receptores Fc, miembros de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas de proteínas, son glucoproteínas de superficie que se pueden unir la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor Fc. Los receptores Fc se definen por su especificidad frente a los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se denominan "FcγR", para IgE "FcεR" y para IgA "FcαR". Diferentes células accesorias llevan receptores Fc para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina las células accesorias que intervendrán en una respuesta dada (Billadeau et al. (2002) J. Clin. Investigat. 2(109):161-81; Gerber et al. (2001) Microbes Infection 3:131-139; Ravetch et al. (2001) Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch et al. (2000) Science 290:84-89; Ravetch (1994) Cell 78(4):553-560; Ravetch et al. (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492; véase también, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (4.ª ed. 1999), Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York). Se presenta una perspectiva general de diversos receptores en la **tabla 1**.

TABLA 1			
Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina			
Receptor	Unión	Tipo de célula	Efecto de la fijación
FcγRI (CD64)	IgG1	Macrófagos	Captación
	10^8 M^{-1}	Neutrófilos	Estimulación
		Eosinófilos	Activación de estallido respiratorio
		Células dendrítica	Inducción de eliminación
FcγRII-A (CD32)	IgG1	Macrófagos	Captación
	$2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Neutrófilos	Liberación de gránulos
		Eosinófilos	
		Células dendrítica	
		Plaquetas	

TABLA 1			
Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina			
Receptor	Unión	Tipo de célula	Efecto de la fijación
		Células de Langerhans	
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1		Sin captación
	2 x 10 ⁶ M ⁻¹	Linfocitos B	Inhibición de la estimulación
		Mastocitos	
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1	Macrófagos	Captación
	2 x 10 ⁶ M ⁻¹	Neutrófilos	Inhibición de la estimulación
		Eosinófilos	
FcγRIII (CD16)	IgG1	Linfocitos citolíticos naturales	
	5 x 10 ⁵ M ⁻¹	Eosinófilos	Inducción de eliminación
		Macrófagos	
		Neutrófilos	
		Mastocitos	
FceRI	IgE		Secreción de gránulos
	10 ¹⁰ M ⁻¹	Mastocitos	
		Eosinófilos	
		Basófilos	
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2	Macrófagos	Captación
	10 ⁷ M ⁻¹	Neutrófilos	Inducción de eliminación
		Eosinófilos	

Cada receptor Fcγ ("FcγR") es una glucoproteína integral de membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un único dominio que abarca la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Hay cuatro FcγR conocidos, denominados FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIV. Los receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los miembros de la familia sugiere que surgieron a partir de un progenitor común, tal vez mediante duplicación génica.

Tanto las señales de activación como inhibitoras se transducen a través de los FcγR tras la fijación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos en los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamados motivos de activación de inmunoreceptores basados en tirosina (ITAM) o motivos de inhibición de inmunoreceptores basados en tirosina (ITIM) explican las diferentes respuestas. La incorporación de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA y FcγRIV, mientras que los complejos que contienen ITIM únicamente incluyen FcγRIIB.

El FcγRI presenta alta afinidad por la región constante del anticuerpo y especificidad de isotipo restringida (Hulett y Hogarth (1994) Adv Immunol 57:1-127). Las proteínas FcγRII son glucoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que se unen únicamente a la IgG en forma de complejo debido a una baja afinidad por Ig monomérica (10⁶ M⁻¹). Este receptor es el FcγR expresado más ampliamente, presente en todas las células hemopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII tiene únicamente dos regiones similares a inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y de ahí una afinidad mucho más baja por IgG que FcγRI. Hay tres genes FcγRII humanos conocidos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), que se unen todos a IgG en agregados o inmunocomplejos. Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. El gen FcγRIIB se

expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es un 96 % idéntico a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible.

Las distintas diferencias en los dominios citoplásmicos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la fijación del receptor. La isoforma FcγRII-A inicia la señalización intracelular que da lugar a la activación celular, tal como fagocitosis y explosión respiratoria, mientras que la isoforma FcγRII-B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibiendo la activación de linfocitos B. El agrupamiento de FcγRIIA por medio de inmunocomplejos o entrecruzamientos de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con cinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la cinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI₃K). La activación celular da lugar a la liberación de mediadores proinflamatorios. Cuando se fijan simultáneamente o agregan simultáneamente junto con un FcγR de activación que tiene un ITAM, tal como FcγRIIA o FcεRI, el ITIM en FcγRIIB se fosforila e incorpora el dominio SH2 de la inositol fosfatasa que contiene homología scr de tipo 2 (SHIP) que, a su vez, se fosforila y asocia con Shc (Ott (2002) *J. Immunol.* 162(9):4430-4439; Yamanshi et al. (1997) *Cell* 88:205; Carpino et al. (1997) *Cell* 88:197). La SHIP hidroliza mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FcγR que contienen ITAM, impidiendo, por consiguiente, la entrada de Ca⁺⁺ intracelular y amortiguando el grado de respuesta celular a la fijación de FcγR. Por tanto, se interrumpe la activación de los linfocitos B, la proliferación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos, y se regula por disminución la fagocitosis mediada por FcγR (Tridandapani et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(7):5082-89).

Específicamente, la agregación simultánea de FcγRIIA con FcγRIIB da como resultado la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa que está implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis, y la agregación simultánea de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad FcεRI en los mastocitos da lugar a la inhibición de la desgranulación inducida por antígeno, la movilización del calcio y la producción de citocinas (Long (1999) *Annu Rev. Immunol* 17:875; Metcalfe et al. (1997) *Physiol. Rev.* 77:1033). La agregación simultánea de FcγRIIB y el receptor de linfocitos B (BCR) da lugar a la inhibición de la señalización mediada por BCR, y la inhibición de la evolución del ciclo celular y la supervivencia celular. Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización por BCR están mediadas a través de SHIP, se ha demostrado recientemente que los linfocitos B activados por lipopolisacáridos (LPS) de ratones deficientes en SHIP muestran inhibición mediada por FcγRIIB significativa de la movilización del calcio, producción de Ins(1,4,5)₃ y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler et al. (2001) *Journal of Immunology* 167(1): 204-211).

El tamaño de FcγRIII varía entre 40 y 80 kDa en el ratón y en el hombre, debido a la heterogeneidad en esta clase. Dos genes humanos codifican dos transcritos, FcγRIIIA, una glucoproteína integral de membrana, y FcγRIIIB, una versión ligada a glucosilfosfatidilinositol (GPI). Un gen murino codifica un homólogo de FcγRIII con respecto al FcγRIIIA humano que abarca la membrana. El FcγRIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos FcγR. Como FcγRII, FcγRIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios extracelulares similares a Ig correspondientes. FcγRIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos, y es el único FcγR en los linfocitos NK. Actualmente se sabe que el FcγRIIIB ligado a GPI se expresa únicamente en los neutrófilos humanos.

FcγRIV (también conocido como mFcRIV) requiere la asociación de la cadena gamma de FcR para la expresión y función óptimas en las células mieloides; su potencial de señalización también se potencia por un motivo citoplásmico "YEPP" que incorpora la molécula adaptadora Crk-L y fosfatidilinositol-3-OH cinasa. FcγRIV se une preferentemente a anticuerpos de inmunoglobulina E del alotipo b (IgEb), así como a anticuerpos IgG2a e IgG2b. La fijación de FcγRIV mediante inmunocomplejos antígeno-IgEb promueve la fagocitosis mediada por macrófagos, la presentación de antígeno a linfocitos T, la producción de citocinas proinflamatorias y la fase tardía de reacciones alérgicas cutáneas (Hirano et al. (2007) *Nature Immunology* 8:762-771). FcγRIV es un receptor identificado recientemente, conservado en todas las especies de mamíferos con afinidad intermedia y especificidad de subclase restringida (Nimmerjahn et al. (2005) *Immunity* 23:41-51; Mechetina et al. (2002) *Immunogenetics* 54:463-468; Davis et al. (2002) *Immunol Rev* 190:23-36). FcγRIII y FcγRIV son FcγR de activación fisiológicamente importantes para mediar la enfermedad inflamatoria desencadenada por anticuerpos citotóxicos o inmunocomplejos patógenos. FcγRI se encuentra en las células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos.

El documento CN 1 958 615 A (China Antibody Pharmaceutical; 2007) divulga un anticuerpo anti-CD20 humanizado, composiciones que contienen el anticuerpo divulgado y usos del mismo en el tratamiento de enfermedades con alta expresión de CD20.

El documento FR 2 894 982 A1 (Lab Francais du Fractionnement; 2007) divulga métodos de producción de anticuerpos que se unen a receptores Fc e incluyen modificaciones particulares de aminoácido en las posiciones 310 y 435.

Shields et al. (2001) "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcγRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRI" *J. Biol. Chem., Am.*

Soc. Biochem. Biologist, 276(9):6591-6604, se refiere a la cartografía de IgG1 humana para receptores Fc humanos, y divulga variantes seleccionadas con unión mejorada a receptores Fc particulares y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos potenciada.

5 A pesar de todos estos avances, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos que posean usos terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de autoinmunidad, cáncer, enfermedad inflamatoria y/o trasplante, que tengan semividas en suero aumentadas, particularmente en seres humanos. También se desea que dichos anticuerpos muestren una capacidad mejorada de mediar la función efectora de los receptores Fc. La presente invención está dirigida a esta y otras necesidades.

10

Sumario de la invención:

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc variante de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento. Los modos de realización de la invención proporcionan polipéptidos que comprenden dominios Fc de inmunoglobulina que tienen una lisina en el residuo 435 de Kabat. Los polipéptidos pueden ser anticuerpos, se pueden unir específicamente a FcRn humano y pueden mostrar unión potenciada a FcRn y/o semivida en suero potenciada. Los polipéptidos pueden comprender un dominio Fc variante, que comprende una o más modificaciones, confiriendo las modificaciones una alteración del fenotipo en el polipéptido, incluyendo función efectora alterada, unión aumentada o disminuida a un FcγR, etc. Los modos de realización de la invención también proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

15

La invención se refiere además a los modos de realización de todos estos polipéptidos del primer aspecto que muestran unión potenciada a FcRn a un pH inferior a 6,5, en comparación con un dominio Fc natural, y particularmente que muestran unión potenciada a FcRn a pH 6,0, en comparación con un dominio Fc natural.

20

La invención se refiere además a los modos de realización de todos estos polipéptidos del primer aspecto que muestran una mayor afinidad de unión a FcRn, en comparación con un dominio Fc natural y/o semivida en suero potenciada (preferentemente al menos 1,5 veces, más preferentemente al menos 2 veces, aún más preferentemente al menos 3 veces mayor que la del polipéptido que tiene un dominio Fc natural).

25

La invención se refiere particularmente a dichos polipéptidos en los que el dominio Fc de inmunoglobulina variante del polipéptido:

30

(A) muestra unión potenciada a FcRn a un pH inferior a 6,5, en comparación con un dominio Fc natural;

35

(B) muestra mayor afinidad de unión a FcRn, en comparación con un dominio Fc natural; o

(C) potencia la semivida en suero del polipéptido.

La invención se refiere particularmente a dichos polipéptidos en los que el dominio Fc de inmunoglobulina variante es un dominio Fc de inmunoglobulina G (IgG) variante y, en particular, en los que la IgG se selecciona del grupo que consiste en la inmunoglobulina G de clase 1 (IgG₁), inmunoglobulina G de clase 2 (IgG₂), inmunoglobulina G de clase 3 (IgG₃) e inmunoglobulina G de clase 4 (IgG₄) y, particularmente, en los que el polipéptido es una cadena pesada de IgG o una parte de la misma.

40

La invención se refiere particularmente a dichos polipéptidos en los que el polipéptido se une a un antígeno tumoral o a un antígeno relacionado con patógenos o a un antígeno humano.

45

La invención se refiere particularmente a dichos polipéptidos en los que el polipéptido es:

50

(A) un anticuerpo monocatenario;

(B) un díacuerpo; o

(C) una cadena polipeptídica de un anticuerpo, o de un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F(ab) de un anticuerpo (incluido un anticuerpo monoclonal)

y especialmente en los que el polipéptido está unido a un polipéptido heterólogo (por ejemplo, un agente terapéutico tal como una citotoxina).

55

La invención se refiere particularmente al modo de realización en el que dichos polipéptidos son un anticuerpo que comprende un dominio Fc que tiene una lisina en el residuo 435 de Kabat, y que presenta al menos uno de:

60

(A) unión potenciada a FcRn a un pH inferior a 6,5, en comparación con un anticuerpo natural;

65

(B) mayor afinidad de unión a FcRn, en comparación con un anticuerpo natural; o

(C) semivida en suero potenciada (preferentemente al menos 1,5 veces, más preferentemente al menos 2 veces, aún más preferentemente al menos 3 veces mayor que la del polipéptido que tiene un dominio Fc natural) en comparación con un anticuerpo natural.

5 La invención se refiere además al modo de realización en el que los polipéptidos descritos anteriormente comprenden al menos una modificación de aminoácido además de una lisina en el residuo 435 de Kabat y un ácido aspártico en el residuo 288 de Kabat. La invención se refiere particularmente a un modo de realización de este tipo en el que la modificación adicional comprende:

10 (A) al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F243L, D270E, R292P, S298N, Y300L, V305I, A330V y P396L;

15 (B) al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L y P396L; F243L y R292P; y R292P y V305I;

(C) al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P e Y300L; F243L, R292P y V305I; F243L, R292P y P396L; y R292P, V305I y P396L;

20 (D) al menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P, Y300L y P396L; y F243L, R292P, V305I y P396L; o

(E) al menos las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

25 La invención se refiere además al modo de realización en el que los polipéptidos descritos anteriormente en los que el dominio de unión a FcRn es un dominio Fc.

30 La invención se refiere además al modo de realización en el que los polipéptidos descritos anteriormente en los que las modificaciones de aminoácido del dominio Fc variante alteran la función efectora (especialmente la función de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) mediada por el dominio Fc.

35 La invención se refiere además al modo de realización en el que las modificaciones de aminoácido del dominio Fc variante del primer aspecto:

(A) aumentan la unión del dominio Fc a un FcγR activador

(B) aumentan la unión del dominio Fc a FcγRIIB

40 (C) disminuyen la unión del dominio Fc a FcγRIIB.

45 La invención se refiere particularmente a dichos polipéptidos en los que el polipéptido se une a un antígeno tumoral o un antígeno relacionado con patógenos (especialmente un antígeno relacionado con patógenos seleccionado del grupo que consiste en antígenos bacterianos, antígenos víricos, antígenos fúngicos y antígenos protozoarios, por ejemplo, un antígeno de viruela, un antígeno del virus del Nilo Occidental, un antígeno del carbunco, un antígeno de la meningitis bacteriana, un antígeno del cólera, un antígeno de *Clostridium difficile*, un antígeno de la enfermedad de Lyme, un antígeno de *Pasteurella pestis*, un antígeno neumocócico, un antígeno estreptocócico, un antígeno de *Clostridium tetani*, un antígeno microcócico o un antígeno de tularemia) o un antígeno humano (especialmente en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en 17-1A, αvβ3, AFP, complejo BCR, CA125, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, proteínas asociadas al ADN, receptor de EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2/neu, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, antígeno SK-1, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF).

55 La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica cualquiera de los polipéptidos de la invención descritos anteriormente.

60 La invención proporciona adicionalmente el uso del polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno tumoral.

La invención proporciona adicionalmente el polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno tumoral.

65 El uso puede ser en solitario, o con un agente terapéutico (por ejemplo, un agente antiangiogénico, un agente antineoplásico, un agente quimioterápico o un agente citotóxico) administrado de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo.

La invención proporciona adicionalmente el polipéptido de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno relacionado con patógenos. La invención proporciona adicionalmente el uso del polipéptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno relacionado con patógenos. La enfermedad infecciosa puede ser especialmente carbunco, meningitis bacteriana, cólera, infección por *Clostridium difficile*, enfermedad de Lyme, peste, neumonía, estreptococo, tétanos, tuberculosis, tularemia, dengue, encefalitis, fiebre hemorrágica, hepatitis, herpes, virus del papiloma humano, gripe, poliomielitis, rabia, viruela, meningitis vírica, fiebre del Nilo Occidental o fiebre amarilla). El uso puede ser en solitario, o con un agente terapéutico (por ejemplo, un agente antibacteriano, agente antifúngico, agente antiprotzoario y un agente antivírico) administrado de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los polipéptidos de la invención descritos anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las ventajas y características adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y ejemplos, que ilustran modos de realización preferentes de la invención.

Breve descripción de los dibujos:

La figura 1 representa un análisis de Biacore de la unión del anticuerpo natural y variante a FcRn.

Las figuras 2 y 3 representan análisis de Biacore de la unión del anticuerpo natural y variante a FcRn, de una manera dependiente del pH. La figura 2 muestra la unión a pH 6,0, y la figura 3 muestra la unión a pH 7,4.

La figura 4 representa un análisis de SPR de unión de hFcRn soluble (400 nM) a Fc ch4420 mutante capturado en la superficie con mIgG1-Flrscn inmovilizado.

La figura 5, paneles A-E representan un análisis de SPR de la unión del anticuerpo natural y variante a Fc γ RIIIA (panel A; V158; panel B; F158), Fc γ RIIB (panel C) y Fc γ RIIA (paneles D y E) humanos solubles.

La figura 6, paneles A-E representan un análisis de SPR de la unión del anticuerpo natural y variante a Fc γ RIIIA (panel A; V158; panel B; F158), Fc γ RIIB (panel C) y Fc γ RIIA (paneles D y E) humanos solubles. Se someten a prueba los mutantes de ch4420 MGFc316 (una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de H435K); MGFc317 (una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de K288D y H435K); y MGFc318 (una variante de Fc 4D5 que tiene sustituciones F243L, R292P e Y300L además de K288D y H435K).

La figura 7 representa un análisis de SPR de la unión de FcRn a mutantes de ch4420 capturados en una superficie con proteína-Flrscn inmovilizada; las respuestas de SPR a pH 6,0 están normalizadas al mismo nivel de anticuerpo. Se someten a prueba los mutantes de ch4420 MGFc315 (K288V/H435D); MGFc316 (una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de H435K); MGFc317 (una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de K288D y H435K); y MGFc318 (una variante de Fc 4D5 que tiene sustituciones F243L, R292P e Y300L además de K288D y H435K).

Las figuras 8A-8E muestran los resultados de las investigaciones de la cinética de unión de las variantes de Fc a FcRn. Los resultados de esta investigación se muestran para la forma natural en la figura 8A (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8B (modelo de afinidad en equilibrio), para la variante de ch4420 N434A en la figura 8C (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8D (modelo de afinidad en equilibrio) y para MGFc315 en la figura 8E (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8F (modelo de afinidad en equilibrio). Los resultados muestran que la variante de ch4420 MGFc315 tenía una KD menor que la de N434A o la de Fc natural.

Las figuras 9A-9B muestran los resultados de las investigaciones de la capacidad de diferentes variantes de ch4420 K288 y de N286K, H435K y de la forma natural de unirse a FcRn.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención proporciona polipéptidos que muestran una unión alterada a FcRn y, particularmente, anticuerpos que muestran unión potenciada a FcRn humano. La invención también proporciona métodos de uso de los anticuerpos y composiciones que los comprenden en enfermedades tales como cáncer y enfermedad infecciosa.

Ahora se hace referencia en detalle a los modos de realización actualmente preferentes de la invención, que, junto con los dibujos y los ejemplos siguientes, sirven para explicar los principios de la invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por parte del experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Un experto en la técnica puede consultar textos de referencia generales para obtener dichas definiciones o para obtener

descripciones detalladas de las técnicas analizadas en el presente documento. Estos textos incluyen Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, y los suplementos hasta marzo de 2008), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, 3.^a ed., 2001); Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual (Selvin y Ha, eds., Cold Spring Harbor Press, 2008); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (Beaucage et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., 2000); Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds., John Wiley & Sons, N.Y., y los suplementos hasta marzo de 2008), Making and Using Antibodies: A Practical Handbook (Howard y Kaser, eds., CRC, 2006); Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Press, 1999); Binding and Kinetics for Molecular Biologists (Goodrich y Kugel, Cold Spring Harbor Press, 2007); Current Protocols in Pharmacology (Enna et al., eds., John Wiley & Sons, N.Y., y los suplementos hasta marzo de 2008), The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman y Gilman, 11.^a ed., 2006), y Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams y Wilkins, 21.^a edición (2005), por ejemplo.

A. DEFINICIONES

15 Como se usa en el presente documento, el término "ADCC" se refiere a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, una reacción mediada por células *in vitro* en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR (por ejemplo, células monocíticas, tales como linfocitos citolíticos naturales (NK) y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana.

20 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a un epítipo, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos que contienen un dominio VL o VH o una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, etc.), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales, Fv biespecíficos enlazados por disulfuro (sdFv), intracuerpos y diacuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, el término anticuerpos pretende abarcar moléculas de inmunoglobulina, fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno y fragmentos de unión a FcRn de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, dominio Fc o fragmentos de dominio de bisagra-dominio Fc. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

35 La referencia a un "receptor antigénico de linfocitos B" o "BCR" pretende hacer referencia al receptor antigénico de linfocitos B, que incluye un componente de unión a antígeno de inmunoglobulina de membrana (mlg), o una porción biológicamente activa del mismo (es decir, una porción que se puede unir a un ligando y/o que se puede asociar con un componente transductor). El término "complejo BCR" pretende hacer referencia al complejo de BCR con el transductor CD79a y componentes CD79b, o porciones biológicamente activas del mismo (es decir, una porción que puede transducir una señal intracelular y/o que se puede asociar con una porción extracelular de unión a ligando).

40 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor que resulta de un crecimiento incontrolado anómalo de células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunos modos de realización, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otros modos de realización, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales cercanas y se extiende a sitios distantes. En algunos modos de realización, el cáncer se asocia con un antígeno del cáncer específico.

50 Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con cierto grado de proliferación celular anormal. En determinados modos de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

55 El término "quimérico", cuando hace referencia a anticuerpos, se refiere a un anticuerpo en el que una porción de una cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con un anticuerpo de una especie (por ejemplo, ratón) o clase o subclase de anticuerpos, mientras la porción restante es idéntica a u homóloga con un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, humana) o clase o subclase de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable procedentes de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

60 Como se usa en el presente documento, el término "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a los residuos aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que son necesarios para la unión a antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR₁, CDR₂ y CDR₃.

65 Como se usa en el presente documento, el término "molécula de diacuerpo" se refiere a un complejo de dos o más proteínas o cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una al menos un dominio V_L y uno V_H o fragmento del mismo, en la que están comprendidos ambos dominios en una única cadena polipeptídica. En determinados modos

de realización una "molécula de diacuerpo" incluye moléculas que comprenden un dominio Fc bisagra o un Fc. Dichas cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, una "molécula de diacuerpo" incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio V_L como V_H . Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar enlazadas de manera covalente a al menos otro péptido del multímero mediante enlaces disulfuro intercatenarios.

Como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a una afección en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por lesión orgánica, tisular y/o celular provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propios órganos, tejidos y/o células. El término "enfermedad inflamatoria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno inflamatorio" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con la inflamación. Además, la inflamación puede estar provocada o no por un trastorno autoinmunitario. De esta manera, determinados trastornos se pueden caracterizar tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

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

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un ligando o receptor Fc. Un anticuerpo puede tener una o más funciones efectoras. Los ejemplos no limitantes de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), unión de C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), opsonización, opsonofagocitosis, unión celular y formación de rosetas. Las funciones efectoras incluyen tanto las que funcionan tras la unión de un antígeno y las que funcionan independiente de la unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a la porción de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que se une inmunoespecíficamente por un anticuerpo. Un epítipo puede tener actividad inmunogénica, de tal manera que suscite una respuesta de producción de anticuerpos en un animal. La capacidad de un epítipo de unirse inmunoespecíficamente a un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante un inmunoanálisis. Los epítipos no tienen que ser necesariamente inmunogénicos.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan en el presente documento para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Un FcR ejemplar es un FcR humano de secuencia natural. Un FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores, por ejemplo, hay al menos dos receptores FcγRII conocidos, FcγRIIA y FcγRIIB. El término FcR también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto.

Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" o "dominio Fc" se usa para definir una región del extremo C de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana está definida para expandirse desde Cys226 al extremo carboxiterminal. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, C_{H2} y C_{H3} . El dominio C_{H2} de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "Cγ2") se extiende normalmente desde el aminoácido 231 al aminoácido 338, y el dominio C_{H3} de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde los aminoácidos 342 a 447.

El término "sitio de glucosilación" se refiere a un residuo o residuos aminoácidos que son reconocidos por una célula de mamífero como una localización para la unión de residuos de azúcar. Los residuos aminoácidos a los que se unen los hidratos de carbono, tales como los oligosacáridos, son generalmente residuos de asparagina (enlace N), serina (enlace O) y treonina (enlace O). Los sitios específicos de unión tienen normalmente una secuencia característica de aminoácidos, denominada "secuencia de sitio de glucosilación". La secuencia de sitio de glucosilación para la glucosilación por enlace N es: Asn-X-Ser/Thr, en el que X puede ser cualquiera de los aminoácidos convencionales distintos de prolina. La región Fc de la IgG humana tiene dos sitios de glucosilación por enlace N, uno en cada uno de los dominios C_{H2} , en la asparagina en la posición 297 (Asn 297).

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta HAMA" se refiere a la respuesta de anticuerpos humanos antimurinos, que es una respuesta inmunogénica perjudicial que se produce cuando un sistema inmunitario humano reconoce un anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA puede provocar choque tóxico o muerte. Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta HAMA disminuyendo las porciones no humanas de anticuerpos administrados, pero todavía hay potencial para una

respuesta inmunitaria de respuesta de anticuerpos humanos antihumanos ("respuesta HAH") frente a dichos anticuerpos.

5 Los términos "cadena pesada", "cadena ligera" ("C_L"), "región variable de la cadena ligera" ("V_L"), "región variable de la cadena pesada" ("V_H"), "región estructural" ("FR"), "dominio constante de la cadena pesada" ("C_H") "dominio constante de la cadena ligera" ("C_L") se refieren a los dominios en inmunoglobulinas naturales y a los correspondientes dominios de proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes), (por ejemplo, anticuerpos humanizados). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. La inmunoglobulina natural se expresa normalmente como una glucoproteína de aproximadamente 150 kDa, aunque también se puede producir IgG en una forma no glucosilada. La porción aminoterminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. La porción carboxiterna ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un único dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG natural es N-V_L-C_L-C y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es N-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-C (en la que H es la región de bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los residuos en contacto con el antígeno y los segmentos no CDR, denominados segmentos estructurales, que conservan la estructura y determinan la posición de los bucles de las CDR. Por tanto, los dominios V_L y V_H tienen la estructura N-FR₁-CDR₁-FR₂-CDR₂-FR₃-CDR₃-FR₄-C.

25 Como se usa en el presente documento, el término ácido nucleico "heterógeno" indica ADN, ARN, etc. que se introduce en una célula huésped. El ácido nucleico puede proceder de cualquiera de una variedad de fuentes, incluyendo ADN genómico, ARNm, ADNc, ADN sintético y fusiones o combinaciones de estos. El ácido nucleico puede incluir un polinucleótido de la misma célula o tipo celular como la célula del receptor o huésped o un polinucleótido de un tipo celular diferente, por ejemplo, de un mamífero o planta, y opcionalmente puede incluir genes de selección o marcador, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a la temperatura, etc.

30 El término "región bisagra" se define generalmente como expandida desde Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

35 Como se usa en el presente documento, el término "humanizado" tiene su significado normal en la técnica. En términos generales, la humanización de un anticuerpo no humano implica sustituir las secuencias de CDR de las regiones V_L y V_H de inmunoglobulina no humana en regiones estructurales humanas. Adicionalmente, como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanizados" pueden comprender sustituciones y mutaciones adicionales en CDR y/o regiones estructurales introducidas para incrementar la afinidad o para otros propósitos. Por ejemplo, la sustitución de residuos estructurales no humanos en la secuencia humana puede incrementar la afinidad. 40 Los dominios variables resultantes tienen secuencias de CDR no humanas y secuencias estructurales procedentes de la(s) secuencia(s) estructural(es) de anticuerpo humana(s) o una secuencia consenso humana. Se puede usar individualmente o en combinación una variedad de regiones estructurales humanas diferentes como base para un anticuerpo humanizado.

45 Como se usa en el presente documento, el término "agente inmunomodulador" y variaciones del mismo se refiere a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En determinados modos de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunodepresor. En otros determinados modos de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulante. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no están limitados a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, 50 agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término "se une inmuno-específicamente", se refiere a la unión específica mostrada entre un anticuerpo y el epítipo que reconoce. Dicha unión muestra típicamente una K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 1 μM, preferentemente al menos aproximadamente 0,1 μM o menos, y lo más preferentemente, 0,01 μM o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente a proteínas con alta afinidad (por ejemplo, K_D baja).

60 Un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno se puede unir a otros péptidos o polipéptidos con afinidad más baja según se determina, por ejemplo, mediante inmunoanálisis, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoanálisis, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

65 El término "técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos", como se usa en el presente documento, se refiere a la tecnología descrita en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 11/952.568; publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040185045, 20040197347, 20040197866, 20050037000, 20050064514, 20050215767,

20050260213, 20060013810, 20060134709, 20060177439, 20070004909, 20070036799, 20070037216, 20070077246, 20070244303, 20080044417, 20080044429, 20080050371, 20080095766 y 20080112961; patentes de EE.UU. n.º 7.112.439; 7.351.803; y 7.355.008; publicaciones de solicitud internacional n.º WO 05/115452, WO 05/110474, WO 06/113665, WO 04/063351, WO 06/088494, WO 06/066078, WO 04/016750, WO 05/018669, WO 07/021841, WO 08/019199, WO 08/002933, WO2007106707, WO2008105886 y WO2008140603.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades inferiores, y el término "anticuerpo policlonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos heterogéneos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único epítipo. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El término "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular.

Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias nucleotídicas" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas y análogos de moléculas de ADN o ARN. Se pueden generar dichos análogos, por ejemplo, usando análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no están limitados a, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que aportan atributos beneficiosos a las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada para cruzar las membranas celulares. Las secuencias nucleotídicas o ácidos nucleicos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, pueden contener ambas porciones monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferentemente es ADN bicatenario.

"Semivida en suero", como se usa en el presente documento, se refiere al tiempo necesario para que la concentración sérica del polipéptido se reduzca en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación de la secuencia o compuesto y/o el aclaramiento o secuestro de la secuencia o compuesto por mecanismos naturales. La semivida en suero de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis farmacocinético.

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia sustancial" se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias (por ejemplo, dominios) que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de residuos aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % de identidad cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima. La identidad de secuencia entre dos secuencias similares (por ejemplo, regiones variables de anticuerpo) se puede medir mediante algoritmos, tales como el de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 [algoritmo de homología local], Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443 [algoritmo de alineación por homología], Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85:2444 [método de búsqueda de similitud], o Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 [algoritmo BLAST]. Al usar cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, se usan los parámetros predeterminados (para longitud de ventana, penalización por hueco, etc.) Se afirma que una secuencia de aminoácidos es "sustancialmente similar a" una segunda secuencia cuando el grado de identidad de secuencia es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica. Se afirma que una secuencia de ácido nucleico es "sustancialmente similar a" una segunda secuencia cuando: (1) el grado de identidad de secuencia es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica a la del polipéptido codificado por la segunda secuencia. Las secuencias que son sustancialmente idénticas también son sustancialmente similares.

Cuando se hace referencia a anticuerpos, la asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con Kabat, Sequences Of Proteins Of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat, y se refiere a la numeración del anticuerpo humano IgG1 EU.

B. ANTICUERPOS

La presente invención se refiere particularmente a polipéptidos con unión alterada a FcRn, y más preferentemente a FcRn humano. Los polipéptidos tienen una afinidad de unión potenciada por FcRn y/o semividas en suero potenciadas, y más preferentemente también tienen una función efectora potenciada, todo ello en comparación con un anticuerpo nativo. En particular, el polipéptido comprende un dominio Fc o de unión a FcRn de inmunoglobulina que tiene una lisina en el residuo 435 de Kabat. Preferentemente, el dominio de inmunoglobulina es humano,

completamente humano, humanizado o quimérico. Preferentemente, el polipéptido es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo variante, por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un dominio Fc variante.

La inmunoglobulina es una IgG, por ejemplo, una IgG selecciona del grupo que consiste en IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, o un fragmento de la misma que se ha modificado para que contenga un dominio de unión a FcRn o un dominio Fc de IgG.

El dominio Fc o de unión a FcRn que comprende una lisina en el residuo 435 de Kabat tiene una afinidad de unión potenciada inesperada por FcRn, y particularmente por FcRn humano. Los polipéptidos que tienen esta modificación muestran unión potenciada a FcRn de una manera dependiente del pH, por ejemplo, unión potenciada a un pH inferior a 6,5, unión potenciada a un pH inferior a 6,0, etc., en comparación con la unión a pH neutros (por ejemplo, aproximadamente 7,0 a 7,5). Esta unión potenciada a FcRn da como resultado una biodisponibilidad aumentada de los polipéptidos, en particular aumentando el transporte de los polipéptidos a un tejido diana, aumentando la liberación de los polipéptidos en el torrente sanguíneo, y similares. Por ejemplo, el FcRn se expresa en las membranas mucosas de adultos, tal como el epitelio intestinal y, por tanto, se espera que los polipéptidos que tienen una unión potenciada a FcRn muestren una biodisponibilidad mejorada después de la administración oral debido al transporte mejorado a través de la pared intestinal. Asimismo, se espera que la presencia de FcRn en el pulmón promueva de forma similar el transporte de los polipéptidos de la invención a través de la mucosa pulmonar al torrente sanguíneo, aumentando, por tanto, la biodisponibilidad de los polipéptidos que se administran por vía intrapulmonar o intranasal.

Los polipéptidos que tienen esta modificación 435K también muestran semividas en suero potenciadas, en comparación con un dominio Fc o de unión a FcRn natural. En un modo de realización, los polipéptidos muestran una semivida en suero en mamíferos (especialmente seres humanos) de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días. En otro modo de realización, los polipéptidos muestran una semivida en suero en mamíferos (especialmente seres humanos) de más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más de 30 días. En un modo de realización preferente, la semivida en suero de los polipéptidos es de al menos 4 días, al menos 7 días, al menos 9 días o al menos 12 días.

En un modo de realización diferente, los polipéptidos muestran una semivida en suero en mamíferos (especialmente seres humanos) que está potenciada, en comparación con un polipéptido que tiene un dominio Fc natural. La semivida en suero potenciada es al menos 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10 o más de 10 veces la semivida en suero de un dominio Fc natural. En otro modo de realización, la semivida en suero potenciada es más de 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 veces la semivida en suero de un dominio Fc natural. En otro modo de realización más, la semivida en suero potenciada es más de 1,5, 3, 5, 7,5 o 10 veces la semivida en suero de un dominio Fc natural.

Los polipéptidos (especialmente anticuerpos) se pueden unir a un antígeno, preferentemente un antígeno humano. En un modo de realización preferente, el antígeno es un antígeno relacionado con una enfermedad o trastorno a tratar con los polipéptidos, por ejemplo, un antígeno tumoral o un antígeno relacionado con patógenos. Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales adecuados incluyen 17-1A, $\alpha\beta 3$, AFP, complejo BCR, CA125, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, proteínas asociadas a ADN, receptores de EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2/neu, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-1, nuC242, antígeno de PEM, antígeno SK-1, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF. Los ejemplos no limitantes de antígenos relacionados con patógenos incluyen antígenos víricos (por ejemplo, proteínas de cubierta, proteína de cápside, antígenos de superficie, etc.), antígenos bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, exotoxinas, antígenos fimbriales, glucolípidos, antígenos O, antígenos de superficie, etc.), antígenos fúngicos (por ejemplo, gp43, micotoxinas, etc.) y antígenos de protozoos (por ejemplo, antígeno de ameba, proteína rica en histidina-2, p30, etc.).

Los polipéptidos (especialmente anticuerpos) contemplados por la presente invención se pueden encontrar en un complejo con otro o con otros polipéptidos no inmunoglobulínicos (por ejemplo, enzimas, hormonas, proteínas estructurales, etc.). Por ejemplo, un modo de realización puede proporcionar un complejo polipéptídico que comprende dos polipéptidos, en el que uno de dichos polipéptidos comprende una cadena pesada y el otro polipéptido comprende una cadena ligera de variante, o en el que ambos polipéptidos comprenden las mismas secuencias. La formación de complejos puede estar mediada por cualquier técnica adecuada, incluyendo mediante dimerización/multimerización en un dominio de dimerización/multimerización, tal como los descritos en el presente documento o interacciones covalentes (tales como a través de un enlace disulfuro) (que en algunos contextos es parte de un dominio de dimerización, por ejemplo, un dominio de dimerización puede contener una secuencia de cremallera de leucinas y una cisteína). En otro modo de realización, una composición puede comprender polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención, por ejemplo, una composición puede comprender una pluralidad de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. Una composición que comprende un

polinucleótido o polipéptido puede estar en forma de un kit o un artículo de fabricación (opcionalmente envasado con instrucciones, tampones, etc.).

También se contempla que se puedan preparar variantes polipeptídicas (y en particular variantes de anticuerpos). Las variantes polipeptídicas pueden poseer modificaciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, deleciones y/o adiciones) en las posiciones deseadas en sus secuencias aminoacídicas con respecto a la secuencia aminoacídica natural. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios aminoacídicos pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo o polipéptido, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana. En un modo de realización preferente, las variantes polipeptídicas y de anticuerpos son variantes de la región Fc.

Las variantes pueden tener misma actividad o alterada en comparación con un polipéptido o anticuerpo natural. Por ejemplo, puede ser deseable que la variante tenga la misma actividad, pero se modifique de una manera que sea más estable o tenga una semivida más larga *in vivo*, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con seroalbúmina o un epítipo de unión a un receptor de rescate, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5.739.277. O, por ejemplo, puede ser deseable que un anticuerpo tenga una afinidad de unión incrementada a antígeno, pero la misma función efectora como anticuerpo natural, o puede ser deseable que un anticuerpo tenga la misma afinidad de unión a antígeno, pero una función efectora disminuida. La actividad se puede someter a prueba, por ejemplo, usando ensayos *in vitro*, tales como ensayos ELISA, ensayos de resonancia por plasmones superficiales, ensayos de unión a proteína radiomarcada (RIA) o ensayos de inmunoprecipitación.

Se pueden efectuar modificaciones sustanciales en la identidad inmunológica o función seleccionando modificaciones que difieren significativamente en su efecto de conservación de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la modificación, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. También se puede emplear análisis de aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua, por ejemplo, como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science* 244:1081-1085. Entre los aminoácidos de barrido preferentes están los aminoácidos neutros relativamente pequeños, tales como alanina, glicina, serina y cisteína. Entre este grupo, la alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferente, porque es el aminoácido más común, con frecuencia se encuentra tanto en posiciones ocultas como expuestas, y porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico. Adicionalmente, se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no implicado en conservar la propia conformación del anticuerpo o polipéptido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento atípico. Sin embargo, en determinadas circunstancias, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo o polipéptido para mejorar su estabilidad.

B1. Variantes de dominios Fc

Los polipéptidos de la presente invención tienen dominios Fc variantes. La modificación del dominio Fc normalmente da lugar a un fenotipo alterado, por ejemplo, semivida sérica alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada. Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para incrementar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo, pero no la muerte de las células que llevan un antígeno diana. Es generalmente deseable una función efectora incrementada al dirigirse a células indeseables, tales como células exógenas o tumorales, en las que los FcγR se expresan en niveles bajos, por ejemplo, linfocitos B específicos de tumor con bajos niveles de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano, LLC y linfoma de Burkitt). En dichos modos de realización, las moléculas de la invención con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección, en el que se desea una eficacia potenciada de la actividad de función efectora.

En determinados modos de realización, las moléculas de la invención comprenden una o más modificaciones en los aminoácidos del dominio Fc, que reducen la afinidad y avidéz de la región Fc y, de esta manera, la molécula de la invención, para uno o más receptores FcγR. En otros modos de realización, las moléculas de la invención comprenden una o más modificaciones en los aminoácidos de la región Fc, que incrementan la afinidad y avidéz de la región Fc y, de esta manera, la molécula de la invención, para uno o más receptores FcγR. En otros modos de realización, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante confiere o media la actividad ADCC incrementada y/o una unión incrementada a FcγRIIA, con respecto a una molécula que no comprenda ningún dominio Fc o que comprenda un dominio Fc natural. En modos de realización alternativos, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante confiere o media la actividad ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión incrementada a FcγRIIB, con respecto a una molécula que no comprenda ningún dominio Fc o que comprenda un dominio Fc natural.

En algunos modos de realización, la invención engloba moléculas que comprenden una región Fc de variante, no mostrando la región Fc de variante una unión detectable a cualquier Fc γ R, con respecto a una molécula comparable que comprenda la región Fc natural. En otros modos de realización, la invención engloba moléculas que comprenden una región Fc de variante, uniéndose únicamente la región Fc de variante a un Fc γ R único, preferentemente uno de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB o Fc γ RIIIA.

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender afinidades alteradas por un receptor Fc γ inhibitor y/o de activación. En un modo de realización, el anticuerpo o polipéptido comprende una región Fc de variante que tiene afinidad incrementada por Fc γ RIIB y afinidad disminuida por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. En otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región Fc de variante, que tiene afinidad disminuida por Fc γ RIIB y afinidad incrementada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. Aún en otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región Fc de variante que tiene afinidad disminuida por Fc γ RIIB y afinidad disminuida por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. Todavía en otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región Fc de variante que tiene afinidad invariable por Fc γ RIIB y afinidad disminuida (o incrementada) por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural.

En determinados modos de realización, la invención engloba inmunoglobulinas que comprenden una región Fc de variante con una afinidad alterada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En un modo de realización preferente, la alteración de la afinidad o función efectora es al menos 2 veces, preferentemente al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces, con respecto a una molécula comparable que comprenda una región Fc natural. En otros modos de realización de la invención, la región Fc de variante se une inmunoespecíficamente uno o más FcR con al menos un 65 %, preferentemente al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 100 %, un 125 %, un 150 %, un 175 %, un 200 %, un 225 % o un 250 % de afinidad mayor con respecto a una molécula que comprenda una región Fc natural. Dichas medidas pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro*, y en un modo de realización preferente son ensayos *in vitro*, tales como ensayos ELISA o de resonancia por plasmones superficiales.

En modos de realización diferentes, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante actúa como agonista de al menos una actividad de un receptor Fc γ R, o actúa como antagonista de al menos una actividad de un receptor Fc γ R. En un modo de realización preferente, las moléculas comprenden una variante que actúa como agonista (o actúa como antagonista) de una o más actividades de Fc γ RIIB, por ejemplo, la señalización mediada por el receptor de linfocitos B, la activación de los linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, la entrada de calcio intracelular de linfocitos B, la evolución del ciclo celular, la inhibición mediada por Fc γ RIIB de la señalización de Fc ϵ RI, la fosforilación de Fc γ RIIB, la incorporación de SHIP, la fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o la actividad de una o más moléculas subsiguientes (por ejemplo, MAP cinasa, JNK, p38 o Akt) en la ruta de transducción de señales de Fc γ RIIB. En otro modo de realización, las moléculas comprenden una variante actúa como agonista (o actúa como antagonista) de una o más actividades de Fc ϵ RI, por ejemplo, la activación de mastocitos, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina.

En determinados modos de realización, las moléculas comprenden un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Los diferentes isotipos de IgG muestran diferentes propiedades físicas y funcionales, incluyendo semivida en suero, fijación del complemento, afinidades de unión a Fc γ R y actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, etc.) debidas a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios Fc y/o bisagra, por ejemplo, como se describe en Fleisch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al. (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 88:9036-9040; o Brüggemann et al. (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de dominio Fc de variante se puede usar solo o en combinación con una modificación aminoacídica para influir en la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. En combinación, la modificación aminoacídica y la región Fc y/o bisagra de IgG pueden mostrar una funcionalidad similar (por ejemplo, afinidad incrementada por Fc γ RIIA) y pueden actuar de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica para modificar la funcionalidad efectora en la molécula de la invención, con respecto a una molécula de la invención que comprenda una región Fc natural. En otros modos de realización, la modificación aminoacídica y la región Fc de IgG pueden mostrar funcionalidad opuesta (por ejemplo, afinidad incrementada y disminuida por Fc γ RIIA, respectivamente) y pueden actuar para reducir o moderar selectivamente una funcionalidad específica en la

molécula de la invención, con respecto a una molécula de la invención que no comprenda ninguna región Fc o que comprenda una región Fc natural del mismo isotipo.

5 En un modo de realización específico preferente, las moléculas comprenden una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación aminoacídica con respecto a una región Fc natural, de tal manera que dicha molécula tenga una afinidad alterada por un FcR, a condición de que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que establecen un contacto directo con FcγR basándose en el análisis cristalográfico y estructural de las interacciones Fc-FcR, tales como las divulgadas por Sondermann et al. (2000) Nature 406:267-73. Los ejemplos de posiciones en la región Fc que establecen un contacto directo con FcγR son los
10 residuos aminoacídicos 234-239 (región bisagra), los residuos aminoacídicos 265-269 (bucle B/C), los residuos aminoacídicos 297-299 (bucle C'/E) y los residuos aminoacídicos 327-332 (bucle F/G). En algunos modos de realización, las moléculas de la invención comprenden regiones Fc de variante que comprenden la modificación de al menos un residuo que no establece un contacto directo con un FcγR en base al análisis cristalográfico y
15 estructural, por ejemplo, no está en el sitio de unión a Fc-FcγR.

Los dominios Fc de variante son bien conocidos en la técnica, y se puede usar cualquier variante de Fc conocida en la presente invención para conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de la invención que comprenda un dominio Fc (o porción del mismo) como se somete a ensayo funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de macrófagos o dependiente de NK. Por ejemplo, en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos se divulgan variantes de dominios Fc identificadas por alterar la función efectora y se puede usar cualquier variante adecuada divulgada en la misma en las presentes moléculas.
20

En determinados modos de realización, las moléculas comprenden una región Fc de variante, que tiene una o más modificaciones aminoacídicas en una o más regiones, alterando la(s) modificación(modificaciones) (con respecto a una región Fc natural) la proporción de afinidades de la región Fc de variante frente a un FcγR de activación (tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) con respecto a un FcγR de inhibición (tal como FcγRIIB):
25

$$\text{Proporción de afinidades} = \frac{\text{Cambio de la forma natural respecto a la variante en la afinidad por Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activador}}}{\text{Cambio de la forma natural respecto a la variante en la afinidad por Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibidor}}}$$

30 Cuando una variante de Fc tiene una proporción de afinidades mayor que 1, los métodos de la invención tienen un uso particular al proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, trastorno o infección, o la mejora de un síntoma de los mismos, cuando se desea una eficacia potenciada de la función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Cuando una variante de Fc tiene una proporción de afinidades menor que 1, los métodos de la invención tienen un uso particular al proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno, o la mejora de un síntoma de los mismos,
35 cuando se desea una eficacia disminuida de la función de células efectoras mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. La tabla 2 enumera las mutaciones únicas, dobles, triples, cuádruples y quíntuples ejemplares, si su proporción de afinidades es mayor que o menor que 1. Los datos de unión específica para diversas mutaciones se enumeran en la tabla 3, y se puede encontrar más información relativa a estas mutaciones en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos.
40

Tabla 2: Mutaciones únicas y múltiples ejemplares enumeradas mediante la proporción de afinidades					
Proporción	Única	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
> 1	F243L	F243L y R292P	F243L, P247L y N421K	L234F, F243L, R292P e Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L
	D270E	F243L e Y300L	F243L, R292P e Y300L	L235I, F243L, R292P e Y300L	
	R292G		F243L, R292P y V305I		
	R292P	F243L y P396L	F243L, R292P y P396L	L235Q, F243L, R292P e Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L y P396L
			F243L, Y300L y P396L		

Tabla 2: Mutaciones únicas y múltiples ejemplares enumeradas mediante la proporción de afinidades					
Proporción	Única	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
		D270E y P396L	P247L, D270E y N421K	F243L, P247L, D270E y N421K	
		R292P e Y300L	R255L, D270E y P396L	F243L, R255L, D270E y P396L	F243L, R292P, V305I, Y300L y P396L
			D270E, G316D y R416G		
		R292P y V305I	D270E, K392T y P396L	F243L, D270E, G316D y R416G	
			D270E, P396L y Q419H		
		R292P y P396L	V284M, R292L y K370N	F243L, D270E, K392T y P396L	
		Y300L y P396L	R292P, Y300L y P396L	F243L, D270E, P396L y Q419H	
				F243L, R292P, Y300L y P396L	
		P396L y Q419H		F243L, R292P, V305I y P396L	
				P247L, D270E, Y300L y N421K	
				R255L, D270E, R292G y P396L	
				R255L, D270E, Y300L y P396L	
				D270E, G316D, P396L y R416G	
< 1	Y300L	F243L y P396L	F243L, R292P y V305I		
	P396L	P247L y N421K			
		R255L y P396L			
		R292P y V305I			
		K392T y P396L			
		P396L y Q419H			

Tabla 3: Información de unión detallada para variantes de Fc ejemplares				
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Proporción de afinidades
				CD16A/CD32B

ES 2 675 730 T3

				V158	F158
Proporción de afinidades > 1					
Clase I: Unión aumentada a CD16; unión disminuida a CD32B					
F243L	4,79	3,44	0,84	5,70	4,10
F243L P247L D270E N421K	2,30	3,45	0,32	7,19	10,78
F243L P247L N421K	1,89	1,71	0,17	11,12	10,06
F243L R255L D270E P396L	1,75	1,64	0,38	4,61	4,32
F243L D270E G316D R416G	1,50	1,34	0,20	7,50	6,70
F243L D270E K392T P396L	3,16	2,44	0,44	7,18	5,55
F243L D270E P396L Q419H	1,46	1,15	0,26	5,62	4,42
F243L R292P	4,73		0,12	39,4	
F243L R292P	4	1,67	0,16	25	10,44
F243L R292P P300L	6,69	2,3	0,32	20,9	7,19
F243L R292P V305I	2,56	1,43	ND	>25	>25
F243L R292P V305I P396L	5,37	2,53	0,40	13,43	6,33
P247L D270E N421K	1,89	2,46	0,58	3,26	4,24
R255L D270E R292G P396L	1,39	1,30	0,65	2,14	2,00
R255L D270E Y300L P396L	1,52	1,74	0,87	1,75	2,00
R255L D270E P396L	1,34	1,65	0,87	1,54	1,90
D270E	1,25	1,48	0,39	3,21	3,79
D270E G316D R416G	2,18	2,49	0,78	2,79	3,19
D270E K392T P396L	1,81	2,28	0,79	2,29	2,89
D270E P396L	1,38	1,65	0,89	1,55	1,85
D270E P396L G316D R416G	1,22		1,07	1,14	
D270E P396L Q419H	1,64	2,00	0,68	2,41	2,94
V284M R292P K370N	1,14	1,37	0,37	3,1	3,7
R292G	1,54		0,25	6,2	
R292P	2,90		0,25	11,60	
R292P V305I	1,32	1,28	0,37	3,6	3,46
Clase II: Unión disminuida a CD16; unión muy disminuida a CD32B					
R292P		0,64	0,25		2,56
R292P F243L		0,6	0,12		5,00
Clase III: Unión aumentada a CD16; unión inalterada a CD32B					
F243I R292P Y300L V305I P396L	10,9	3,12	1,05	10,4	2,97
F243L R292P Y300L P396L	10,06	5,62	1,07	9,40	5,25
R292P V305I P396L	1,85	1,90	0,92	2,01	2,07
Clase IV: Unión muy aumentada a CD16; unión aumentada a CD32B					
F243L R292P Y300L V305I P396L	10,06	8,25	1,38	7,29	5,98

Tabla 3: Información de unión detallada para variantes de Fc ejemplares					
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Proporción de afinidades	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
Proporción de afinidades > 1					
Clase I: Unión aumentada a CD16; unión disminuida a CD32B					
D270E G316D P396L R416G	1,22		1,07	1,14	
Proporción de afinidades < 1					
Clase V: Unión inalterada a CD16; unión aumentada a CD32B					
R255L P396L	1,09		2,22	0,49	
Y300L	1,01		1,18		0,99
Clase VI: Unión aumentada a CD16; unión muy aumentada a CD32B					
F243L P396L	1,49	1,60	2,22	0,67	0,72
P247L N421K	1,29	1,73	2,00	0,65	0,87
R255L P396L		1,39	2,22	0,49	0,63
R292P V305I	1,59	2,11	2,67	0,60	0,79
K392T P396L	1,49	1,81	2,35	0,63	0,77
P396L	1,27	1,73	2,58	0,49	0,67
P396L Q419H	1,19	1,19	1,33	0,89	0,89
Clase VII: Unión disminuida a CD16; unión aumentada/inalterada a CD32B					
D270E G316D P396L R416G		0,94	1,07		0,88

En otros modos de realización, las moléculas comprenden una región Fc variante que tiene una o más sustituciones de aminoácido, que son sustituciones que alteran (con respecto a una región Fc natural) la unión de la región Fc variante, por ejemplo, potencian la unión a un Fc γ R activador (tal como Fc γ RIIA o Fc γ RIIIA) y/o reducen la unión a un Fc γ R inhibitor (tal como Fc γ RIIB). Se diseñaron diversas mutaciones de Fc que tienen uno o más cambios de aminoácido y se analizaron por resonancia por plasmones superficiales para la k_{off} , como se muestra en la tabla 4. Las constantes de velocidad de disociación para la unión de los diversos Fc γ R se determinaron mediante análisis BIAcore y se compararon directamente con las del Fc natural, con la proporción ($x = WT k_{off}/k_{off}$ mutante) indicada en las columnas de la derecha de la tabla 4 con respecto a cada Fc γ R sometido a prueba.

Tabla 4: Comparación de k_{off} de Fc mutantes con Fc natural					
Mutante	Cambios de aminoácido	CD16A _V	CD16A _F	CD32A _H	CD32B
Un aminoácido					
1	F24 3L	4,8	3,4	0,6	0,8
2	D27 0E	1,3	1,5	2,2	0,4
3	R29 2P	2,4	1,6	0,7	0,3
4	S29 8N	nd	nd	np	0,2
5	Y30 0L	1,0	1,2	2,9	1,2
6	V30 5I	0,9	0,6	1,3	1,2
7	A33	0,6	1,2	0,4	0,3

Tabla 4: Comparación de k_{off} de Fc mutantes con Fc natural									
Mutante	Cambios de aminoácido					CD16A _V	CD16A _F	CD32A _H	CD32B
	0V								
8					P39 6L	1,3	1,7	1,6	2,6
Dos aminoácidos									
9	F24 3L				P39 6L	2,2	2,0	1,5	1,6
10	F24 3L	R29 2P				4,0	1,7	0,5	0,2
11		R29 2P		V30 5I		1,3	1,3	0,8	0,4
Tres aminoácidos									
12	F24 3L	R29 2P	Y30 0L			7,4	4,6	1,0	0,6
13	F24 3L	R29 2P		V30 5I		2,6	1,4	0,2	0,1
14	F24 3L	R29 2P			P39 6L	6,3	3,4	1,4	0,4
15		R29 2P		V30 5I	P39 6L	1,9	1,9	1,5	0,9
Cuatro aminoácidos									
16	F24 3L	R29 2P	Y30 0L		P39 6L	10,1	5,6	1,7	1,1
17	F24 3L	R29 2P		V30 5I	P39 6L	4,0	2,3	0,8	0,4
Cinco aminoácidos									
18	F24 3L	R29 2P	Y30 0L	V30 5I	P39 6L	10,1	8,3	3,2	1,4

Abreviaturas: nd, unión no detectable; np, no probado. Los valores con ≥ 80 % de diferencia ($\geq 0,8$ veces) de la forma natural en cualquier dirección están en negrita. El sombreado indica mutantes de Fc identificados directamente por presentación en levadura; todos los demás mutantes se construyeron por mutagénesis dirigida al sitio.

También hay una amplia guía en la técnica de tecnologías de ingeniería de anticuerpos con respecto a las modificaciones deseables. Las modificaciones ejemplares que pueden ser deseables en ciertas circunstancias se enumeran a continuación:

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
- En un modo de realización específico, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 o 330 y preferentemente uno o más de los siguientes residuos: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328, V330. En un modo de realización específico diferente, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 y preferentemente uno o más de los siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300, L300.
 - En un modo de realización preferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un Fc γ R con una afinidad alterada, cualquier modificación de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. Preferentemente, la región Fc variante tiene cualquiera de los siguientes residuos: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360, A430.
 - En un modo de realización diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un Fc γ R (a través de su región Fc) con una afinidad reducida, cualquier modificación de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439.

- En un modo de realización diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (a través de su región Fc) con una afinidad potenciada, cualquier modificación de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430. En un modo de realización diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγRIIA con una afinidad potenciada, cualquiera de los siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337, A430.

En otros modos de realización, la invención abarca el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tales como las divulgadas en Jefferis et al. (2002) *Immunol Lett* 82:57-65; Presta et al. (2002) *Biochem Soc Trans* 30:487-90; Idusogie et al. (2001) *J Immunol* 166:2571-75; Shields et al. (2001) *J Biol Chem* 276:6591-6604; Idusogie et al. (2000) *J Immunol* 164:4178-84; Reddy et al. (2000) *J Immunol* 164:1925-33; Xu et al. (2000) *Cell Immunol* 200:16-26; Armour et al. (1999) *Eur J Immunol* 29:2613-24; Jefferis et al. (1996) *Immunol Lett* 54:101-04; Lund et al. (1996) *J Immunol* 157:4963-69; Hutchins et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 92:11980-84; Jefferis et al. (1995) *Immunol Lett.* 44:111-17; Lund et al. (1995) *FASEB J* 9:115-19; Alegre et al. (1994) *Transplantation* 57:1537-43; Lund et al. (1992) *Mol Immunol* 29:53-59; Lund et al. (1991) *J. Immunol* 147:2657-62; Duncan et al. (1988) *Nature* 332:563-64; patentes de EE.UU. n.º 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; y 7.317.091; y publicaciones PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

La función efectora se puede modificar mediante técnicas, tales como las descritas en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos, o mediante otros medios. Por ejemplo, se puede introducir un residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región, dando como resultado la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento y ADCC incrementadas. Véase Caron et al. (1992) *J. Exp Med.* 176:1191-1195; y B. Shopes (1992) *J. Immunol.* 148:2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también se pueden preparar usando reticuladores heterobifuncionales, como se describe en Wolff et al. (1993) *Cancer Research* 53:2560-65. Alternativamente, se puede generar mediante ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y así tenga lisis por el complemento potenciada y capacidades de ADCC. Stevenson et al. (1989) *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230.

B2. Modificaciones de secuencia

Generalmente, las modificaciones de secuencia puede ser la sustitución, delección o adición de uno o más residuos en el anticuerpo o polipéptido que da como resultado un cambio en la secuencia aminoacídica en comparación con la secuencia natural. Se puede encontrar orientación para determinar qué residuo aminoacídico se puede someter a inserción, sustitución o delección sin influir adversamente en la actividad deseada comparando la secuencia del anticuerpo o polipéptido con la de las moléculas proteicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia aminoacídica hechos en regiones de homología alta. Se puede determinar la variación permitida haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a prueba las variantes resultantes para determinar la actividad mostrada por la secuencia natural madura o de longitud completa.

Las sustituciones aminoacídicas pueden implicar la sustitución conservadora o no conservadora de uno o más residuos. Dichas sustituciones son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, una sustitución conservadora supone reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades químicas y/o estructurales similares, tal como el reemplazo de una leucina con una serina. Las sustituciones no conservadoras suponen generalmente reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades químicas y/o estructurales diferentes, por ejemplo, un aminoácido ácido (por ejemplo, Glu) se puede reemplazar con un aminoácido básico (por ejemplo, Asn).

Un tipo particularmente preferente de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano), a fin de obtener un anticuerpo de variante que tenga propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando expresión en fago. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable para generar todas las posibles sustituciones aminoacídicas en cada sitio, de esta manera, las variantes de anticuerpo generadas se expresan en fago, y entonces se criban las variantes expresadas en fago frente a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se puede seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para el desarrollo posterior.

La modificación también puede implicar la incorporación (por ejemplo, mediante sustitución o adición) de aminoácidos no naturales, por ejemplo, mediante métodos tales como los descritos, por ejemplo, en Wang et al. (2002) Chem. Comm. 1:1-11; Wang et al. (2001) Science 292:498-500; y van Hest et al. (2001) Chem. Comm. 19:1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácil ARNt, como se describe, por ejemplo, en Tang et al. (2001) J. Am. Chem. 123(44):11089-11090; y Kiick et al. (2001) FEBS Lett. 505(3):465.

En un modo de realización preferente, se han modificado 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos aminoacídicos. De forma adicional o alternativa, dichas modificaciones se pueden caracterizar por no tener más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos aminoacídicos modificados. De forma adicional o alternativa, dichas modificaciones se pueden caracterizar por no tener más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 residuos aminoacídicos modificados. Las modificaciones pueden ser todas sustituciones o cualquier combinación de sustituciones, deleciones o adiciones.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias aminoacídicas se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias aminoacídicas naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o de sitio dirigido), mutagénesis por restricción y selección, mutagénesis por PCR, y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión de no variante del anticuerpo.

B3. Otras modificaciones

Las variantes polipépticas (y especialmente variantes de anticuerpos) de la presente invención incluyen análogos y derivados que se modifican, por ejemplo, mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión a epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen los que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a escisión química, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Se pueden modificar los anticuerpos y polipéptidos mediante la introducción de uno o más sitios de glucosilación en los anticuerpos, la deleción de uno o más sitios de glucosilación de los anticuerpos o desplazamiento de un sitio de glucosilación existente en los anticuerpos, preferentemente sin alterar la funcionalidad deseada de los anticuerpos, por ejemplo, la actividad de unión. Se pueden introducir sitios de glucosilación en, o someter a deleción de, la región variable y/o constante de los anticuerpos, mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir un sitio de glucosilación en un anticuerpo de la invención mediante la modificación o mutación de una secuencia aminoacídica del anticuerpo, de modo que se obtiene la secuencia deseada (por ejemplo, Asn-X-Thr/Ser), y se puede desplazar un sitio de glucosilación modificando la posición 296 en la región Fc, de modo que la posición 296 y no la posición 297 no se glucosila. Los métodos de modificación del contenido de hidratos de carbono (glucosilación) de las proteínas son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 6.472.511 y 6.218.149; las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20030115614 y 20020028486; el documento EP 0359096 B1; y el documento WO 03/035835.

En algunos modos de realización, las moléculas de la invención se generan mediante ingeniería para que comprendan un patrón de glucosilación alterado o una glucoforma alterada. Las glucoformas generadas mediante ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero no limitados a, potenciar la función efectora. Las glucoformas generadas mediante ingeniería se pueden generar mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de cepas de expresión de variantes o generadas mediante ingeniería, mediante la expresión simultánea con una o más enzimas, por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), mediante la expresión de un anticuerpo de la invención en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o mediante la modificación de hidrato(s) de carbono después de que el anticuerpo se haya expresado y purificado. Los métodos para generar glucoformas generadas mediante ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a los descritos, por ejemplo, en Okazaki et al. (2004) JMB 336:1239-1249; Shinkawa et al. (2003) J Biol Chem 278:3466-3473; Shields et al. (2002) J Biol Chem 277:26733-26740; Davies et al. (2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294; Umana et al. (1999) Nat. Biotechnol 17: 176-180; patente de EE.UU. n.º 6.602.684; publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20030157108, 20030115614 y 20030003097; documentos WO 02/311140; WO 02/30954; WO 01/292246; WO 00/61739; tecnología Potillegent™ disponible de Biowa, Inc. (Princeton, NJ); y la tecnología para la ingeniería de glucosilación GlycoMAb™ disponible de GLYCART biotechnology AG (Zúrich, Suiza).

B4. Conjugados polipépticos

Los polipéptidos de la presente invención se pueden fusionar de manera recombinante o conjugar químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterógenos o porciones de los mismos para generar proteínas de fusión. Preferentemente, el polipéptido de la presente invención (especialmente un anticuerpo) se fusiona con al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, 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 heterógeno para generar una proteína de fusión deseada. La fusión no tiene que ser necesariamente directa, pero se puede producir a través de secuencias enlazadoras. Los polipéptidos de la presente invención también se pueden unir a soportes sólidos o matrices semisólidas, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del antígeno diana. Dichos soportes y matrices incluyen, pero no están limitados a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), microesferas de agarosa, microesferas de acrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Por ejemplo, la unión se puede efectuar mediante métodos descritos en *Methods in Enzymology*, 44 (1976).

Los anticuerpos y polipéptidos se pueden conjugar a un agente terapéutico a fin de modificar una respuesta biológica dada, influir en (por ejemplo, incrementar) la semivida sérica del agente terapéutico o dirigir el agente terapéutico a un subconjunto particular de células. También se pueden fusionar a secuencias marcadoras (por ejemplo, un péptido con hexahistidina o una etiqueta "flag") para facilitar la purificación. Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas; véase, por ejemplo, Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a ed., Robinson et al. (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.).

Las proteínas de fusión adicionales se pueden generar a través de las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominados colectivamente "barajado de ADN"). Se puede emplear el barajado de ADN para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas). Los anticuerpos y polipéptidos de la invención, o sus ácidos nucleicos codificantes, se pueden alterar adicionalmente sometiendo a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterógenas.

B5. Fragmentos

La invención proporciona adicionalmente anticuerpos y otros fragmentos polipeptídicos. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o extremo C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína o anticuerpo natural de longitud completa. Determinados fragmentos pueden carecer de residuos aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada. Estos fragmentos se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos polipeptídicos o de anticuerpo mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por residuos aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislar el fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico o de anticuerpo deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos polipeptídicos o de anticuerpo comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido o anticuerpo natural divulgado en el presente documento.

En algunos modos de realización, un polipéptido de la invención comprende adicionalmente un dominio de dimerización, que puede comprender una secuencia de dimerización, y/o una secuencia que comprende uno o más residuos de cisteína. En algunos modos de realización, el dominio de dimerización se localiza entre un dominio variable de la cadena ligera o cadena pesada del anticuerpo y al menos una porción de una proteína de cubierta vírica, y uno o más enlaces disulfuro y/o una única secuencia de dimerización puede estar presente en el dominio de dimerización para proporcionar la expresión bivalente. En algunos modos de realización, las cadenas pesadas de un F(ab)₂ se dimerizan en un dominio de dimerización que no incluye una región bisagra. El dominio de dimerización puede comprender una secuencia de cremallera de leucinas.

En otro modo de realización, los fragmentos polipeptídicos de la presente invención comprenden una secuencia aminoácida de al menos 5 residuos aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos aminoácidos contiguos, al menos 30 residuos aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos aminoácidos contiguos de la secuencia aminoácida de otro polipéptido. En un modo de realización específico, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función del polipéptido.

B6. Diacuerpos y DART

También se proporcionan por la presente invención diacuerpos y reactivos de redirección de afinidad dual ("DART"). Los diacuerpos y DART comprenden dominios de unión a antígeno procedentes generalmente de anticuerpos y polipéptidos de la invención. El diseño y la construcción de diacuerpos y DART se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20070004909 publicada el 4 de enero de 2007; Marvin et al. (2005) Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658; Olafsen et al. (2004) Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 90:6444-6448. Cada cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo comprende un dominio V_L y un dominio V_H , del mismo o de diferentes anticuerpos, que se unen covalentemente de tal manera que se impide el autoensamblaje de los dominios. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas produce dos emparejamientos V_L - V_H , que forman dos sitios de unión a epítipo, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio V_H ni el V_L está constreñido a ninguna posición en la cadena polipeptídica, ni tampoco están restringidos los dominios en sus posiciones relativas entre sí; la única restricción es que una cadena polipeptídica complementaria esté disponible a fin de formar diacuerpo funcional. Los dominios se pueden separar por un enlazador peptídico y las cadenas polipeptídicas se pueden generar mediante ingeniería para que comprendan al menos un residuo de cisteína en cada cadena, de modo que se pueden formar los enlaces disulfuro intercatenarios para estabilizar el diacuerpo.

Cuando los dominios V_L y V_H proceden del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas, dando como resultado un anticuerpo monoespecífico bivalente, o pueden ser diferentes, dando como resultado un anticuerpo biespecífico bivalente (por ejemplo, uno que se une a dos epítopos diferentes en el mismo antígeno). Cuando los dominios V_L y V_H proceden de anticuerpos específicos para antígenos diferentes, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. En un modo de realización particular, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como un linfocito B o linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

En diversos modos de realización, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc en las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo dimerizan preferentemente, dando como resultado la formación de una molécula de diacuerpo que muestra propiedades similares a inmunoglobulina, por ejemplo, las interacciones Fc-Fc γ R. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, que comprenden dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una un dominio V_H , un dominio V_L y un dominio Fc. En diversos modos de realización, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio bisagra, que puede proceder de cualquier alotipo o isotipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En modos de realización preferentes, el dominio bisagra procede de IgG, en los que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de la misma. El dominio bisagra se puede generar mediante ingeniería en una cadena polipeptídica en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de la cadena, y en determinadas circunstancias se puede generar mediante ingeniería junto con un dominio Fc, de tal manera que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio Fc bisagra.

En otros modos de realización, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros, que pueden comprender dos cadenas polipeptídicas "más pesadas" (es decir, una cadena polipeptídica que comprende un V_L , un V_H y un dominio Fc), y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras" (es decir, una cadena polipeptídica que comprende un V_L y un V_H). Dichas cadenas más ligeras y más pesadas pueden interaccionar para formar un monómero, e interaccionan por medio de sus dominios Fc no emparejados para formar una molécula similar a Ig, que puede ser una molécula de DART. Dicho diacuerpo similar a Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico. Las especies de DART similares a Ig tienen propiedades únicas, porque se pueden diseñar sus dominios para que se unan al mismo epítipo (para formar un DART similar a Ig específico monoepítipo tetravalente que se pueda unir a cuatro moléculas de antígeno idénticas) o a epítopos o antígenos diferentes. Por ejemplo, se pueden diseñar sus dominios para que se unan a dos epítopos del mismo antígeno (para formar un DART similar a Ig específico biepitopo específico monoantígeno tetravalente), o a epítopos de moléculas de antígeno diferentes para formar un DART similar a Ig tetravalente que tenga un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Las moléculas híbridas que tienen combinaciones de dichos atributos se pueden producir fácilmente.

Sin pretender vincularse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpo de la invención muestran eficacia terapéutica potenciada con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse inmunoespecíficamente a una célula diana que expresa un antígeno particular (por ejemplo, Fc γ R) en niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer en la célula diana más tiempo debido a una avidéz mejorada de la interacción diacuerpo-epítipo. De esta manera, los diacuerpos de la invención tienen utilidad particular en el tratamiento, prevención o regulación de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, en una subpoblación, en la que el antígeno diana se expresa en niveles bajos en la población celular diana.

Debido a su valencia incrementada, las velocidades de disociación bajas y el aclaramiento rápido de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, de o por debajo ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la formación de imágenes de tumores (Fitzgerald et al. (1997) Protein Eng. 10:1221). De particular importancia es el entrecruzamiento de las células diferentes, por

ejemplo, el entrecruzamiento de linfocitos T citotóxicos con respecto a células tumorales (Staerz et al. (1985) Nature 314:628-31; Holliger et al. (1996) Protein Eng. 9:299-305). Los dominios de unión a epítipo del diacuerpo también se pueden dirigir a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en los linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otras células mononucleares.

5 En muchos estudios, también se descubrió que la unión del diacuerpo a determinantes de células efectoras, por ejemplo, receptores Fc γ R (Fc γ R), activaba la célula efectora (Holliger et al. (1996) Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) Cancer Res. 59:2909-2916). Habitualmente, la activación de células efectoras se desencadena mediante la unión de un anticuerpo unido a antígeno con respecto a una célula efectora por medio de la interacción Fc-Fc γ R; de esta manera, en este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden mostrar funcionalidad similar a

10 Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc. Entrecruzando las células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a la proximidad de las células tumorales, sino que da lugar a la muerte del tumor eficaz. Cao and Lam (2003) Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-97.

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención se pueden producir usando una variedad de métodos, incluyendo la síntesis de proteínas *de novo* y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas se pueden producir mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado) o mediante síntesis de ADN en fase sólida. Preferentemente se usan métodos de expresión recombinante.

15 En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un V_H y/o V_L de CD16A; en otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un V_H y/o V_L de CD32B. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia aminoacídica de inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

25 B7. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden producir u obtener de una diversidad de formas. Por ejemplo, dichos anticuerpos se pueden obtener a partir de plasma, de manera sintética, recombinante o transgénica, por medio de cultivo celular (por ejemplo, hibridoma), etc. La producción de proteínas sintéticas se ha descrito, por ejemplo, en Dawson et al. (2000) Ann. Rev Biochem. 69:923-960; Wilken et al. (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9(4):412-426; y Kochendoerfer et al. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(6):665-671.

La producción de anticuerpos recombinantes y transgénicos se ha descrito, por ejemplo, en Wang et al. (2007) IDrugs 10(8):562-565; Hagemeyer et al. (2007) Semin. Thromb. Hemost. 33(2):185-195; Rasmussen et al. (2007) Biotechnol. Lett. 29(6):845-852; Gasser et al. (2007) Biotechnol. Lett. 29(2):201-212; Aubrey et al. (2006) J. Soc. Biol. 200(4):345-354; Laffly et al. (2006) J. Soc. Biol. 200(4):325-343; Jefferis (2005) Biotechnol Prog. 21(1):11-16; Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57(9):912-917; Kipriyanov et al. (2004) Mol Biotechnol. 26(1):39-60; Fischer et al. (2003) Vaccine 21(7-8):820-825; Maynard et al. (2000) Ann. Rev. Biomed. Eng. 2:339-376; Young et al. (1998) Res. Immunol. 149(6):609-610; y Hudson (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9(4):395-402.

La producción de anticuerpos por medio de cultivo celular (por ejemplo, hibridoma) se ha descrito, por ejemplo, en Laffly *et al.* (2006), *supra*; Aldington et al. (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 848(1):64-78; S.S. Farid (2006) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 848(1):8-18; Birch et al. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58(5-6):671-685; Even et al. (2006) Trends Biotechnol. 24(3):105-108; Graumann et al. (2006) Biotechnol. J. 1(2):164-86; patente de EE.UU. n.º 7.112.439; y publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20070037216 y 20040197866.

Se pueden producir anticuerpos por medio de métodos de expresión en fago, tales como los divulgados, por ejemplo, en Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-86; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-58; Persic et al. (1997) Gene 187:9-18; Burton et al. (1994) Advances in Immunology 57:191-280; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y 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. También se puede usar la tecnología de expresión en fago para incrementar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. La tecnología, denominada maduración de afinidad, emplea mutagénesis o avance de CDR y selección usando el antígeno afín para identificar los anticuerpos que se unen con afinidad más alta al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial u original. Véase, por ejemplo, Glaser et al. (1992) J. Immunology 149:3903; Wu et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 95:6037; Yelton et al. (1995) J. Immunology 155:1994; Schier et al. (1996) J. Mol. Bio. 263:551.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, métodos de hibridoma como se describe, por ejemplo, en Kohler et al. (1975) Nature 256:495; Kozbor et al. (1983) Immunology Today 4:72, o Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 o métodos de ADN recombinante como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567 o los anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de expresión en fago usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628 y Marks et al. (1991), J. Mol. Biol.

222:581-597, por ejemplo. Se pueden usar diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales con respecto a un antígeno de interés. Por ejemplo, se pueden inmunizar diversos animales huésped mediante inyección con un antígeno de interés o derivado del mismo, incluyendo, pero no limitados a, conejos, ovejas, cabras, perros, ratones, ratas y conejillo de Indias, y después de dejar que se produzca una respuesta inmunológica, se pueden identificar los anticuerpos a partir de los sueros de los animales inmunizados.

También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, a través de la expresión simultánea de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes, seguido de purificación de la molécula deseada usando cromatografía de afinidad, como se describe por Milstein et al. (1983) *Nature* 305:537-39, documento WO 93/08829, Traunecker et al. (1991) *EMBO J.* 10:3655-59. En un enfoque diferente, se fusionan los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina, por ejemplo, a un dominio constante de la cadena pesada, que comprende al menos parte de las regiones C_{H2}, C_{H3} y bisagra. Se pueden insertar los ácidos nucleicos que codifican estas fusiones en los mismos o diferentes vectores de expresión, y se expresan en un organismo huésped adecuado.

Se pueden producir anticuerpos totalmente humanos (también denominados anticuerpos completamente humanos) usando ratones transgénicos que no puedan expresar genes endógenos de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas, pero que puedan expresar genes humanos de la cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los transgenes de inmunoglobulina humanos albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Se describe una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, por ejemplo, en Lonberg y Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, y la patente de EE.UU. n.º 5.633.425. También se pueden producir anticuerpos totalmente humanos usando otras técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de expresión en fago, como se describe por Hoogenboom y Winter (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381 y Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222:581. También se pueden obtener comercialmente anticuerpos totalmente humanos de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y Genpharm (San José, Calif.). Se pueden generar anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo, como se describe, por ejemplo, por Jaspers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899-903.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican las moléculas polipeptídicas de la invención. Se pueden obtener los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, y se puede determinar la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. En un modo de realización, se pueden cribar las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica, mediante técnicas estándar conocidas en la técnica para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

B8. Caracterización de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar en una variedad de maneras. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden someter a ensayo para determinar la capacidad de unirse inmuno-específicamente a un antígeno, por ejemplo, HER2/neu, o, si la molécula comprende un dominio Fc (o porción del mismo), para determinar la capacidad de mostrar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de un dominio de Fc (o porción del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo se puede realizar en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-421), en microesferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), en perlas (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), en bacterias (patente de EE.UU. n.º 5.223.409), en esporas (patentes de EE.UU. n.º 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 89:1865-1869) o en fago (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 87:6378-6382; y Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310). Las moléculas que se han identificado para unirse inmuno-específicamente a un antígeno entonces se pueden someter a ensayo para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Los inmunoanálisis que se pueden usar para analizar la unión inmuno-específica, reactividad cruzada e interacciones Fc-FcγR incluyen, pero no están limitados a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas, tales como inmuno-electrotransferencia, radioinmunoanálisis, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoanálisis de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos inmunocromatográficos, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, ensayos de inmunofluorescencia e inmunoanálisis de proteína A, etc. (véase, por ejemplo, Ausubel et al., 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*).

La afinidad de unión por un antígeno diana se mide o determina típicamente mediante ensayos de anticuerpo-antígeno estándar, tales como ensayos competitivos Biacore, ensayos de saturación o inmunoanálisis, tales como ELISA o RIA.

5 Preferentemente, se usa la separación celular activada por fluorescencia (FACS), que usa cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, para ensayos basados en mecanismos inmunológicos o funcionales para caracterizar las moléculas de la invención. Los separadores de flujo pueden examinar rápidamente un gran número de células individuales que han sido unidas, por ejemplo, opsonizadas, por moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora). Adicionalmente, los parámetros específicos usados para la optimización del comportamiento del anticuerpo, incluyen, pero no están limitados a, concentración de antígeno, tiempo de competencia cinética o restricción de FACS, cada uno de los cuales se puede variar a fin de seleccionar las moléculas de anticuerpo que muestran propiedades de unión específica. Los citómetros de flujo para separar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.347.935; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ en venta por Becton Dickinson and Company y el sistema COPAS™ en venta por Union Biometrica.

Se pueden usar ensayos basados en resonancia de plasmón superficial para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión a antígeno o unión Fc-FcγR. Se puede usar cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, la tecnología descrita, por ejemplo, en Dong et al. (2002) Review in Mol. Biotech. 82:303-323; Mullet et al. (2000) Methods 22:77-91; Rich et al. (2000) Current Opinion in Biotechnology 11:54-61; Fivash et al. (1998) Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; y patentes EE.UU. n.º 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; y 6.268.125. Los datos se usan para representar las curvas de unión y determinar las constantes de velocidad, por ejemplo, K_{on} , K_{off} y la constante de unión en el equilibrio aparente K_d , por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en Myszka (1997) Current Opinion in Biotechnology 8:50-57; O'Shannessy et al. (1996) Analytical Biochemistry 236:275-283; Morton et al. (1995) Analytical Biochemistry 227:176-185; Fisher et al. (1994) Current Opinion in Biotechnology 5:389-95; O'Shannessy (1994) Current Opinion in Biotechnology 5:65-71; y Chaiken et al. (1992) Analytical Biochemistry 201:197-210. En modos de realización preferentes, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis por RPS se pueden usar como una medida predictiva de cómo una molécula funciona en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC.

Se puede realizar la caracterización de la unión a FcγR mediante moléculas que comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) y/o que comprenden dominio de unión a epítipo específico para un FcγR de acuerdo con los métodos descritos en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos. Son bien conocidos los ensayos para determinar las funciones de células efectoras, por ejemplo, como se describe en Abdul-Majid et al. (2002) Scand. J. Immunol. 55:70-81; Perussia et al. (2000) Methods Mol. Biol. 121:179-192; Lehmann et al. (2000) J. Immunol. Methods 243(1-2):229-242; Ding et al. (1998) Immunity 8:403-411; Baggiolini et al. (1998) Experientia 44(10):841-848; Brown (1994) Methods Cell Biol. 45:147-164; y Munn et al. (1990) J. Exp. Med. 172:231-237.

Por ejemplo, se pueden realizar ensayos para determinar la fagocitosis mediada por FcγR usando monocitos humanos, midiendo la capacidad de las células THP-1 de fagocitar eritrocitos de carnero (SRBC) opsonizados por IgG fluoresceinados mediante métodos descritos previamente en Tridandapani et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:20480-20487, o usando un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) como se describe por Bedzyk et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(3):1565-1569. Se pueden usar métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica usados para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (o porciones de los mismos). Por ejemplo, para determinar la unión de C1q, se puede realizar un ELISA de unión de C1q, y para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al. (1996) J. Immunol. Methods 202:163.

En otro modo de realización, se pueden someter a ensayo las moléculas de la invención para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en las células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Weng et al. (2003) J. Clin. Oncol. 21:3940-3947; Perussia et al. (2000) Methods Mol. Biol. 121:179-192; Ding et al. (1998) Immunity 8:403-411. En un modo de realización preferente específico, se usa un ensayo fluorimétrico en tiempo retardado para medir la actividad ADCC frente a células diana marcadas de manera fluorescente, como se describe, por ejemplo, en Blomberg et al. (1996) Journal of Immunological Methods 193:199-206. Las células diana usadas en los ensayos de ADCC de la invención incluyen, pero no están limitadas a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de acceso ATCC HTB-30 (Treppe et al. (1976) Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de acceso ATCC CCL-86 (Epstein et al. (1965) J. Natl. Cancer Inst. 34:231-240), y células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (Klein et al. (1968) Cancer Res. 28:1300-1310). Las células diana se deben reconocer por el sitio de unión a antígeno de la molécula que se va a ensayar. Preferentemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferentemente a partir de sangre humana normal

usando métodos estándar conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque.

C. MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La administración de las composiciones (por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos) de la presente invención puede ser por un propósito "profiláctico" o "terapéutico", o alternativamente se puede usar para propósitos de diagnóstico. Se afirma que las composiciones de la presente invención se administran por un propósito "terapéutico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar un tratamiento para una manifestación real de la enfermedad. Cuando se proporciona terapéuticamente, el compuesto se proporciona preferentemente al identificar (o poco después) un síntoma de la enfermedad real. La administración terapéutica del compuesto sirve para atenuar la gravedad de dicha enfermedad o invertir su evolución. Se afirma que las composiciones de la presente invención se administran por un propósito "profiláctico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar un tratamiento para una afección o enfermedad potencial. Cuando se proporciona profilácticamente, el compuesto se proporciona preferentemente con antelación a cualquier síntoma de la misma. La administración profiláctica del compuesto sirve para prevenir o atenuar cualquier avance o recurrencia posterior de la enfermedad.

Proporcionar un tratamiento o "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como moderación, remisión, disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente, reducir la velocidad de degeneración o empeoramiento, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, o mejorar el bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o mejora de los síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de una exploración física, exámenes neuropsiquiátricos y/o una evaluación psiquiátrica.

Los sujetos preferentes para el tratamiento incluyen animales, más preferentemente especies de mamíferos, tales como seres humanos u otros primates, y animales domésticos, tales como perros, gatos y similares, sujetos a la enfermedad y otras afecciones patológicas. Un "paciente" se refiere a un sujeto, preferentemente mamífero (incluyendo ser humano).

El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que tiene un efecto terapéutico para tratar profilácticamente o terapéuticamente un trastorno. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, así como otros agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con, o conjugados a, un anticuerpo o polipéptido. En un modo de realización preferente, el agente terapéutico es un anticuerpo de la presente invención, y preferentemente es un fragmento de anticuerpo, un diacuerpo, un DART similar a Ig o una proteína de fusión.

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, infección o trastorno en el que se desea una unión potenciada a FcRn y/o semivida en suero aumentada mediada por FcRn (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, alergias, etc.). Por ejemplo, las moléculas de la invención que muestran unión potenciada a FcRn, particularmente unión dependiente del pH a FcRn potenciada, muestran una biodisponibilidad aumentada después de la administración, particularmente administración gastrointestinal, genital, nasal, ocular, oral, pulmonar y rectal. Además, las moléculas de la invención que muestran semividas en suero aumentadas son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades, infecciones o trastornos en los que la exposición aumentada y mantenida al agente terapéutico es beneficiosa, porque la semivida en suero más larga generalmente permite que se administre el agente terapéutico con menos frecuencia, y en una dosis más baja.

En algún modo de realización, las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, infección o trastorno en el que se desea una función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa). Por ejemplo, las moléculas de la invención se pueden unir a un antígeno de superficie celular y un FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, linfocito NK), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) frente a dicha célula. En algunos modos de realización, los anticuerpos y polipéptidos de la invención son especialmente adecuados para el tratamiento de cánceres. La eficacia del tratamiento con anticuerpos monoclonales estándar depende del polimorfismo de FcγR del sujeto. (Carton et al. (2002) Blood 99:754-758; Weng et al. (2003) J Clin Oncol. 21(21):3940-3947). Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras y median la ADCC. Los alelos de alta afinidad mejoran la capacidad de las células efectoras de mediar la ADCC. Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden comprender un dominio Fc de variante que muestra afinidad potenciada por FcγR (con respecto a un dominio Fc natural) en células efectoras, proporcionando de esta manera mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes con independencia de su polimorfismo de FcγR.

Para propósitos de diagnóstico, los anticuerpos o polipéptidos se pueden acoplar a una sustancia detectable, de modo que se pueden usar, por ejemplo, para controlar el desarrollo o evolución de una enfermedad, trastorno o infección. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, etc.), grupos prostéticos (por ejemplo, avidina/biotina), materiales fluorescentes (por

ejemplo, umbeliferona, fluoresceína o ficoeritrina), materiales luminiscentes (por ejemplo, luminol), materiales bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa o aequorina), materiales radioactivos (por ejemplo, carbono 14, manganeso 54, estroncio 85 o cinc 65), metales emisores de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente a las moléculas de la invención o bien indirectamente a través de un intermedio (por ejemplo, un enlazador) usando técnicas conocidas en la técnica.

C1. Trastornos tratables

Los trastornos ejemplares que se pueden tratar mediante diversos modos de realización de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, trastornos proliferativos, trastornos proliferativos celulares, y cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. En diversos modos de realización, la invención engloba métodos y composiciones para el tratamiento, prevención o regulación de una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas (anticuerpos o polipéptidos) que se unen a un antígeno de la enfermedad. Por ejemplo, las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, inhibición, reducción del crecimiento o remisión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Sin pretender vincularse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de la invención median la función efectora, dando como resultado la remisión del tumor, la reducción del tumor o una combinación de las mismas. En modos de realización alternativos, los anticuerpos de la invención median la actividad terapéutica mediante el entrecruzamiento de receptores y/o antígenos de superficie celular y apoptosis potenciada o señalización reguladora del crecimiento negativa.

Los anticuerpos con una afinidad disminuida por FcγRIIB y una afinidad aumentada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden dar lugar a una respuesta de activación potenciada tras la unión a FcγR y, por tanto, tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir el cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres tratables mediante los métodos en el presente documento incluyen el linfoma mielóide agudo, carcinoma suprarrenal, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, sarcoma de tejido conjuntivo y huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de bronquios, cáncer cervical, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de vesícula biliar, cáncer gastrointestinal, glioma, tricoleucemia, hepatocarcinoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer del conductillo biliar intrahepático, cáncer articular, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, leucemia, cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica, linfoma, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer de oído medio, mieloma múltiple, mieloma, mixosarcoma, cáncer de fosas nasales, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, carcinoma amicrocítico de pulmón, cáncer de nariz, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer renal, cáncer de la glándula salival, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma epidermoide, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer urinario, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer vesicular, cáncer de vulva, y tumor de Wilms.

En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer hematopoyético o cáncer relacionado con la sangre, tal como linfoma, leucemia, mieloma, neoplasia maligna linfóide, cáncer del bazo y cáncer de los ganglios linfáticos. En un modo de realización preferente, el cáncer es un cáncer asociado a linfocitos B, tal como, por ejemplo, linfoma de grado bajo, intermedio o alto (incluyendo linfoma de linfocitos B, tal como, por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma de linfocitos B del tejido linfático asociado a mucosa, linfoma no hodgkiniano, linfoma linfocítico de células pequeñas y linfomas de linfocitos T) y leucemias (incluyendo leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de linfocitos B (CD5 + linfocitos B), leucemia mielóide crónica, leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielodisplasia, leucemia mielóide, tal como leucemia mielóide aguda y leucemia secundaria), mieloma múltiple, tal como neoplasia maligna de células plasmáticas, y otros cánceres asociados a linfocitos B o linfocitos T y/o hemáticos. Otros cánceres ejemplares son cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y linfocitos citolíticos naturales.

En algunos modos de realización, el cáncer que se va a tratar es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma suprarrenal o carcinoma amicrocítico de pulmón. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de mama o cáncer de próstata. En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer en el que se sobreexpresa HER2/neu. En un modo de realización específico, un anticuerpo o polipéptido de la invención inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 %, o al menos un 10 % con respecto al crecimiento de células cancerosas en ausencia del anticuerpo o polipéptido de la invención.

Los anticuerpos con una afinidad aumentada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden dar lugar a una respuesta de activación reducida tras la unión a FcγR y, por tanto, tienen eficacia terapéutica para

tratar y/o prevenir la inflamación y enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias o afecciones relacionadas con mecanismos autoinmunitarios que se pueden tratar por lo métodos del presente documento incluyen, pero no están limitadas a, afecciones alérgicas, encefalomielitís alérgica, neuritis alérgica, rinitis alérgica, alopecia areata, ELA, anemia, incluyendo anemia aplásica, anemia de Coombs positiva, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, y eritroblastopenia (APCR), espondiloartritis anquilosante, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos antimembrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidicos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis juvenil, artrosis, artropatía soriasica), asma, aterosclerosis, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluyendo ooforitis y orquitis autoinmunitaria, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves-Basedow, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatías poliglandulares), diabetes de tipo I también denominada diabetes mellitus insulín dependiente (DMID) y síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, poliendocrinopatías autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), bronquiolitis obliterante (no de trasplante), miocardiopatía incluyendo arteriopatía coronaria, síndrome de Castleman, celiacía (enfermedad celíaca), urticaria autoinmunitaria crónica, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad por crioglobulinas, colitis, afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, crioglobulinemia, lupus eritematoso cutáneo, dermatitis incluyendo dermatitis atópica, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, eccema, encefalitis, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia del factor VIII, fibromialgia, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad injerto contra huésped (EICH), granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y granulocitopenia, síndrome de Guillain-Barré, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, neuropatía por IgA y neuropatía mediada por IgM, nefritis por inmunocomplejos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, diabetes de tipo 1, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, deficiencia de adhesión leucocitaria, leucocitopenia, liquen plano, lupus (incluyendo nefritis, no renal, discoide, alopecia), neumonía intersticial linfocítica (VIH), enfermedad de Ménière, meningitis, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome de lesión multiorgánica, esclerosis múltiple, miastenia grave, neumonía intersticial no específica (NINE), pancitopenia, penfigoide (por ejemplo, penfigoide ampolloso y penfigoide cicatrizal), pénfigo (por ejemplo, vulgar, foliáceo y pénfigo paraneoplásico), policondritis, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, soriasis, glomerulonefritis rápidamente progresiva, enfermedad de Reiter, síndrome de dificultad respiratoria incluyendo síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), respuestas asociadas con enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), fenómeno de Reynaud, sarcoidosis, síndrome de Sjögren, rechazo de trasplantes de vísceras macizas (incluyendo el pretratamiento para valores de anticuerpos reactivos de perfil alto, depósito de IgA en tejidos, etc.), síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso diseminado (LED), esclerodermia incluyendo la esclerodermia sistémica, síndrome de CREST y esclerosis, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), necrólisis epidérmica tóxica, tuberculosis, uveítis, vasculitis, tal como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vasculitis asociada a ANCA (VAA), vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, y la arteritis de Takayasu), vasculitis de vasos medios (incluyendo enfermedad de Kawasaki, granulomatosis de Wegener y panarteritis nudosa) y vasculitis de vasos pequeños (incluyendo arteritis de Churg-Strauss, poliarteritis/poliarteritis microscópica, hipersensibilidad/vasculitis alérgica, púrpura de Schoenlein Henoch y vasculitis crioglobulinémica esencial) y vitiligo. En un modo de realización preferente, el trastorno autoinmunitario está seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, soriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, diabetes de tipo 1 y vasculitis.

Los ejemplos no limitantes de trastornos inflamatorios tratables por los métodos del presente documento incluyen trastornos inflamatorios mediados por mecanismos inmunitarios (IMID), que son afecciones inflamatorias provocadas y mantenidas por una respuesta inmunitaria patológica específica de antígeno. Entre estos trastornos se encuentran diversos tipos de enfermedades alérgicas, tales como asma, alergia al polen y urticaria, artritis, tal como artrosis y artritis reumatoide, inflamación crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos del tejido conjuntivo, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto y enfermedad injerto contra huésped, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), osteólisis inflamatoria, diabetes insulín dependiente, fibrosis pulmonar, retinitis, artropatía indiferenciada, espondiloartropatía indiferenciada y uveítis. También se pueden usar las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc de variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIA para prevenir el rechazo de trasplantes. En un modo de realización preferente, el IMID se selecciona del grupo que consiste en asma, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped y enfermedad intestinal inflamatoria.

Los polipéptidos antiinflamatorios de la presente invención reducen preferentemente la inflamación en un animal en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %,

al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal que no recibe dichos polipéptidos.

5 En determinados modos de realización, los polipéptidos de la invención son tóxicos para un agente infeccioso, potencian la respuesta inmunitaria frente a dicho agente o potencian la función efectora frente a dicho agente, con respecto a la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar o prevenir mediante las moléculas de la invención están provocadas por agentes infecciosos incluyendo, pero no limitados a bacterias, hongos, protozoos y virus.

10 Las enfermedades bacterianas ilustrativas no limitantes incluyen las causadas por *Bacillus anthracis* (carbunco), *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), cándida, clamidia, cólera, difteria, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Legionella pneumophila*; *Chlamydia pneumoniae*; neumonía por *Pneumocystis carinii*, legionela, micobacteria, micoplasma, *Neisseria*, *Clostridium difficile* (tosferina), *Pasteruralla pestis* (peste), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Salmonella*, estafilococo, estreptococo y *Clostridium tetani* (tétanos). En un modo de realización preferente, la enfermedad bacteriana se selecciona del grupo que consiste en carbunco, meningitis bacteriana, cólera, infección, enfermedad de Lyme, peste, neumonía, infección estreptocócica, tétanos, tuberculosis y tularemia.

20 Los ejemplos no limitantes de enfermedades víricas incluyen las provocadas por adenovirus, arbovirus, coronavirus, virus de Coxsackie, citomegalovirus, ébola, equinovirus, virus ECHO, endotoxina (LPS), enterovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, hepatitis murina), virus del herpes (por ejemplo, herpes simple de tipo I (VHS-I), herpes simple de tipo II (VHS-II), virus del herpes gamma murino), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II), hantavirus, gripe, virus de la leucemia (por ejemplo, leucemia murina, leucemia felina, etc.); virus del sarampión, virus de las paperas, papilomavirus, papovavirus, virus de la poliomieltis, virus respiratorio sincicial, retrovirus, rinovirus, peste bovina, rotavirus, virus de la rubéola, viruela, virus linfotrópico de linfocitos T 1, vaccinia, varicela, y agentes de enfermedades víricas, tales como meningitis vírica, encefalitis o dengue. En un modo de realización preferente, la enfermedad vírica se selecciona del grupo que consiste en dengue, encefalitis, fiebre hemorrágica, hepatitis, herpes, virus del papiloma humano, gripe, poliomieltis, rabia, viruela, meningitis vírica, fiebre del Nilo Occidental y fiebre amarilla.

35 Los ejemplos no limitantes de enfermedades por protozoos incluyen las causadas por amebas, helmintos y otros parásitos, tales como *Acanthamoeba*, *Babesia*, *Balantidium*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Microsporidia*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trichomonas* y *Trypanosoma*. En un modo de realización preferente, la enfermedad por protozoos es paludismo. Los ejemplos no limitantes de enfermedades fúngicas incluyen aspergilosis, infección por cándida, criptococosis, meningitis fúngica, neumonía fúngica, histoplasmosis, mucormicosis, infección por *Pneumocystis*, esporotricosis y fiebre coccidioidosis aguda.

40 C2. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, y pueden incluir un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden encontrar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, de comprimidos, 45 píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta un 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles, únicamente por nombrar unas pocas alternativas no limitantes. Dichas composiciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido, por ejemplo, mezclando el ingrediente activo con el o los 50 vehículos o excipientes en condiciones estériles.

Los ingredientes activos también se pueden formular para que proporcionen una liberación rápida, mantenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden modificar u optimizar las características físicas y químicas de las composiciones de la invención 55 de acuerdo con el experto en la técnica, dependiendo del modo de administración y la enfermedad o trastorno particular que se va a tratar. Las composiciones se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria, un recipiente sellado, o como parte de un kit, que puede incluir instrucciones para su uso y/o una pluralidad de formas de dosificación unitarias.

60 En modos de realización particulares, se pueden incorporar los agentes terapéuticos en una composición, por ejemplo, mediante encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que puedan expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. En otro modo de realización particular, los agentes terapéuticos se suministran como un polvo liofilizado 65 esterilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente precintado herméticamente y se puede reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para su administración a un sujeto.

Preferentemente, el agente terapéutico se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a 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 polvo liofilizado se debe almacenar entre 2 y 8 °C en su recipiente original y las moléculas se deben administrar por vía parenteral 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 tras haberse reconstituido. En un modo de realización alternativo, los agentes terapéuticos se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente indicando la cantidad y concentración del agente terapéutico. Preferentemente, la forma líquida se suministra en un recipiente sellado herméticamente en 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, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

C3. Kits

Las composiciones también pueden estar incluidas en un kit. En aspectos no limitantes, el kit puede incluir una composición farmacéutica que comprenda un agente terapéutico, instrucciones para su administración y/u otros componentes. En modos de realización preferentes, el kit puede incluir una composición lista para su administración. Los recipientes de los kits pueden incluir un frasco, dosificador, envase, compartimiento u otros tipos de recipientes en los que se pueda colocar un componente. El recipiente puede incluir indicaciones en su superficie. Por ejemplo, las indicaciones pueden ser una palabra, una frase, una abreviatura, una imagen o un símbolo. Los recipientes pueden dosificar una cantidad predeterminada del componente (por ejemplo, las composiciones de la presente invención). La composición se puede dosificar en un pulverizador, un aerosol, o en una forma líquida o forma semisólida. Los recipientes pueden tener mecanismos de pulverización, bombeo o compresión. En determinados aspectos, el kit puede incluir una jeringuilla para administrar las composiciones de la presente invención.

Cuando hay más de un componente en el kit (se pueden envasar conjuntamente), el kit también contiene generalmente un segundo, tercero u otros recipientes adicionales en los que se pueden colocar por separado componentes adicionales. Los kits también pueden incluir un recipiente que aloje los componentes en un espacio cerrado para su venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que se guardan los frascos, dosificadores o envases deseados. Un kit también puede incluir instrucciones para emplear los componentes del kit, así como el uso de cualquier otra composición, compuesto, agente, ingrediente activo u objeto no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir una explicación de cómo aplicar, usar y conservar los productos o composiciones.

C4. Administración y dosificación

Están disponibles una variedad de vías de administración para las composiciones de la presente invención. Por supuesto, el modo particular seleccionado depende del agente terapéutico particular seleccionado, si la administración es para la prevención, diagnóstico o tratamiento de la enfermedad, la gravedad del trastorno médico que se está tratando y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la presente invención se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable y produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen, pero no están limitados a, oral, bucal, sublingual, por inhalación, mucosa, rectal, intranasal, tópico, ocular, periocular, intraocular, transdérmico, subcutáneo, intrarterial, intravenoso, intramuscular, parenteral o metodologías de infusión. En un modo de realización específico, puede ser deseable administrar localmente las composiciones farmacéuticas de la invención en el área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluya membranas, tales como membranas sialásticas o fibras.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio provechoso para el paciente, es decir, curación o mejora de las afecciones crónicas, una reducción de los síntomas, un incremento de la velocidad de curación de dichas afecciones, o un cambio detectable en los niveles de una sustancia en el tejido tratado o circundante. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o simultáneamente.

La pauta posológica y las cantidades eficaces para usos terapéuticos y profilácticos, es decir, el "régimen de dosificación", depende de una variedad de factores, incluyendo la etapa de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, edad y similares. La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación. Por ejemplo, existen

5 numerosos métodos de determinación de la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 por ciento de la población) y la DL₅₀ (la dosis letal del 50 por ciento de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DE₅₀/DL₅₀. Son preferentes las composiciones que muestran índices terapéuticos altos. Se pueden usar los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celular o estudios con animales en la formulación de un intervalo de dosificaciones para uso humano. La dosificación está preferentemente en un intervalo de concentraciones que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad, y puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

10 El régimen de dosificación también tiene en cuenta los parámetros de farmacocinética bien conocidos en la técnica, es decir, la velocidad de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, aclaramiento y similares (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611-617; Groning (1996) *Pharmazie* 51:337-341; Fotherby (1996) *Contraception* 54:59-69; Johnson (1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146; Rohatagi (1995) *Pharmazie* 50:610-613; Brophy (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108; el último Remington, arriba). El estado de la técnica permite que el médico determine el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente terapéutico y enfermedad o afección tratada. Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones de la presente invención se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia según se requiera y tolere por el paciente. La duración del tratamiento profiláctico y terapéutico varía dependiendo de la enfermedad o afección particular que se está tratando. Algunas enfermedades se prestan a un tratamiento agudo, mientras que otras requieren un tratamiento a largo plazo. Si la administración no es diariamente, por ejemplo, si las inyecciones se dan cada pocos días, cada pocas semanas, o cada pocos meses, entonces, se puede incluir más agente terapéutico en cada administración, de modo que la liberación diaria del agente es adecuada para satisfacer las necesidades terapéuticas.

25 Los agentes terapéuticos de la invención se pueden administrar en regímenes de dosificación metronómicos, mediante infusión continua o administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación en intervalos constantes sin periodos de descanso. Típicamente los agentes terapéuticos, en particular, los agentes citotóxicos, se usan en dosis más bajas. Dichos regímenes de dosificación engloban la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante periodos prolongados de tiempo, lo que puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. Kamat et al. (2007) *Cancer Research* 67:281-88. En determinados modos de realización, los agentes terapéuticos se administran mediante una dosis baja crónica o infusión continua que varía desde aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. La pauta de dichos regímenes de dosis se puede optimizar por el oncólogo experto.

40 Para los anticuerpos englobados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. Se pueden reducir o alterar la dosificación y frecuencia de administración potenciando la absorción y penetración en tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones, tales como, por ejemplo, lipidación. En un modo de realización, la dosificación de los anticuerpos administrados a un paciente es de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se usan como monoterapia. En otro modo de realización, los anticuerpos se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación que se pretende administrar a un paciente es más baja que cuando dichas moléculas se usan como monoterapia. En un ejemplo preferente, se trata un sujeto con anticuerpos en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas.

C5. Tratamientos de combinación

55 También se describe la administración de los anticuerpos o polipéptidos de la invención en combinación con otros tratamientos conocidos para los expertos en la técnica para el tratamiento o prevención del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, o enfermedad infecciosa, incluyendo pero no limitados a, quimioterapias experimentales y estándar actuales, tratamientos hormonales, tratamientos biológicos, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunos modos de realización, los anticuerpos o polipéptidos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos conocidos para los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o intoxicación.

65 Como se usa en el presente documento, el término "combinación" se refiere al uso de más de un agente terapéutico. El uso del término "combinación" no restringe el orden en el que se administran los agentes terapéuticos a un sujeto con un trastorno, ni tampoco significa que los agentes se administren exactamente en el mismo momento, sino más

bien significa que un anticuerpo o polipéptido de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y en un intervalo de tiempo, de tal manera que el anticuerpo o polipéptido de la invención pueden actuar conjuntamente con el otro agente para proporcionar un beneficio incrementado que si se hubieran administrado de otro modo. Por ejemplo, cada agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, tratamiento hormonal o tratamiento biológica) se puede administrar en el mismo momento o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran en el mismo momento, se debe administrar suficientemente próximos en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, uno por vía oral y uno por vía parenteral.

En diversos modos de realización, un primer agente terapéutico se puede administrar antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante con, o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo (o posterior) agente terapéutico a un sujeto con un trastorno. En modos de realización preferentes, se administran dos o más agentes en la misma visita del paciente, o con no más de 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia.

En ciertos modos de realización, los agentes terapéuticos se pueden administrar de manera cíclica a un sujeto. El tratamiento en ciclos implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o tercer agente durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial. El tratamiento en ciclos puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más de los tratamientos, evitar o reducir los efectos secundarios de uno de los tratamientos, y/o mejora la eficacia del tratamiento. Los ciclos ejemplares son de aproximadamente una vez cada semana, aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas, y aproximadamente una vez cada tres semanas. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos a administrar es desde aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más típicamente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos y más típicamente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

En un modo de realización, para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede conjugar con, o se puede administrar en combinación con, otro agente terapéutico, tal como, pero no limitado a, un agente alquilante (por ejemplo, mecloretamina o cisplatino), inhibidor de la angiogénesis, antraciclina (por ejemplo, daunorubicina/daunomicina o doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, o antramycin), anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, tal como bevacizumab (en venta como AVASTIN® por Genentech, Inc.), un anticuerpo anti-EGFR, tal como panitumumab (en venta como VECTIBIX™ Amgen, Inc.), o un anticuerpo anti-integrina, tal como natalizumab (en venta como TYSABRI® por Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc.)), un antimetabolito (por ejemplo, metotrexato o 5-fluorouracilo), un agente antimetabólico (por ejemplo, vincristina o paclitaxel), una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente de hormonoterapia (por ejemplo, un modulador selectivo del receptor estrogénico (por ejemplo, tamoxifeno o raloxifeno), inhibidor de la aromatasa, análogo de luterina, gestágeno, adrenocorticosteroide, estrógeno, andrógeno, agente antiestrógenos, agente bloqueante del receptor androgénico, inhibidor de la 5-alfa-reductasa, inhibidor de la producción suprarrenal, etc.), un inhibidor de la metaloproteasa de matriz, un elemento radioactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.) o cualquier otro agente quimioterápico.

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la angiogénesis adecuados incluyen ABT-627; angiostatina (fragmento del plasminógeno); angiozima; antitrombina antiangiogénica III; Bay 12-9566; benefina; bevacizumab; BMS-275291; bifosfonatos; inhibidor derivado del cartilago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endoestatina (fragmento del colágeno XVIII); inhibidores de la farnesil-transferasa (FTI); fragmento de fibronectina; gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina 12; kringle 5 (fragmento del plasminógeno); marimastat; inhibidores de la metaloproteína (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; neovastat; NM-3; panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador del plasminógeno; factor plaquetario 4 (PF4); prinomastat; fragmento de 16 kDa de prolactina; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol S; tetratiomolibdato; talidomida; trombospondina 1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento y transformación beta (TGF-β); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; y ZD 6474.

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adicionales para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluyen anticuerpos para 17-1A, αvβ3, AFP, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, proteínas asociadas a ADN, receptores de EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, antígeno SK-1, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, tal como, pero no limitado a, anticuerpos, agentes anticolinérgicos, agonistas beta, metilxantinas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, celecoxib o diclofenaco), y fármacos antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo, glucocorticoides, dexametasona, cortisona, prednisona o icosanoides). Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de enfermedad inflamatoria, tal como, pero no limitados a anticuerpos para integrina alfa4beta7, beta2, CBL, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD11/18, CD14, CD18, CD23, CD25, CD40L, CD64 (FcR), CD80, CD147, complemento (C5), selectina E, Fact VII, gpIIb/IIIa, ICAM-3, IgE, IL-4, IL-5, IL-8, TNF-alfa y VLA-4.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, tal como, pero no limitado a, anticuerpos, brequinar, ciclofosfamida, ciclosporina A, moduladores del receptor de citocinas, desoxiespergualina, leflunomida, antibióticos macrólidos, malononitroloamidas (por ejemplo, leflunamida), metotrexato, metilprednisolona, mizoribina, micofenolato mofetilo, rapamicina (sírolimus), esteroides y moduladores del receptor de linfocitos T. Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, y los ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos para receptor de integrinas $\alpha 4\beta 7$, antígeno CBL, CD2, CD4, CD23, CD40, CD80, FcRI, interferon gamma, IL-8, inosina monofosfato deshidrogenasa, ICE interleucina 1 beta, P38MAP cinasa y TNF.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, tal como, pero no limitado a, un agente antivírico, antifúngico o antibiótico. Los antibióticos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprima), aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, neomicina o espectinomicina), anfenicoles (por ejemplo, cloranfenicol), anfomicinas, ansamicinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), bacitracinas, carbacefemos (por ejemplo, loracarbef), carbapenemas (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefalexina o cefadroxil), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), claritromicinas, eritromicinas, lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), macrólidos (por ejemplo, tobramicina), monobactamas (por ejemplo, carumonam), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, y cloruro de furazolium), oxacefemos (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas, quinolonas (por ejemplo, ofloxacina o ciprofloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, bencilsulfamida y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona de sodio, y solasulfona) y tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina y clortetraciclina).

Los agentes antifúngicos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, anfotericina B, butoconazol, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulmina, haloprogrina, intratecal, itraconazol, ketoconazol, miconazol, naftifina, nistatina, terbinafina, terconazol, tioconazol y undecilenato. Los agentes antivíricos útiles que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, análogos de nucleósidos, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa e inhibidores de proteasa. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes son aciclovir, adefovir, interferones alfa, amantadina, amprenavir, clevadine, entecavir, foscarnet, ganciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina y zidovudina.

C6. Demostración de la utilidad terapéutica

Las composiciones farmacéuticas, agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento se someten a prueba preferentemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un modelo de organismo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que se pueden usar para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica incluyen ensayos de cultivo celular en los que se cultiva una muestra de tejido del paciente en cultivo, y se expone a, o de otro modo se pone en contacto con, una composición farmacéutica de la invención, y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido se puede obtener mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profiláctica(s) o terapéutica(s) terapéuticamente más eficaz/eficaces para cada paciente individual. En diversos modos de realización específicos, se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T) para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado sobre dichos tipos celulares.

Los sistemas de modelos animales adecuados incluyen, pero no están limitados a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede usar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos se pueden someter a prueba en un sistema de modelo de ratón. Los modelos animales preferentes para su uso son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan Fc γ R humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, se puede usar cualquier modelo murino descrito en el documento US 5.877.396.

La actividad antiinflamatoria se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al.(eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Por ejemplo, los modelos de artritis inducida por adyuvante, tales como artritis inducida por colágeno, cimosano o carragenina en ratas, hámsters, conejos, perros y cerdos, son útiles en el estudio de la actividad antiinflamatoria, y la inhibición del edema plantar inducido por carragenina en ratas es un cribado primario *in vivo* para determinar la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictiva de la eficacia en seres humanos. Por ejemplo, estos modelos se describen en Winter et al. (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:544-47; y Hansra et al. (2000) *Inflammation* 24(2):141-155. También se pueden usar modelos animales para la enfermedad intestinal inflamatoria para evaluar la eficacia de los tratamientos de la invención, por ejemplo, los modelos descritos, por ejemplo, en Strober (1985) *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Supl.):3S-10S; Kim et al. (1992) *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537). En estos modelos, se pueden inducir la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en animales mediante administración oral de polisacáridos sulfatados, sulfato de dextrano o irritantes químicos.

La eficacia en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios se puede evaluar usando modelos animales para trastornos autoinmunitarios, tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso diseminado y glomerulonefritis, por ejemplo, los modelos descritos en Flanders et al. (1999) *Autoimmunity* 29:235-246; Krogh et al. (1999) *Biochimie* 81:511-515; Foster (1999) *Semin. Nephrol.* 19:12-24, etc.

La actividad antineoplásica de los agentes terapéuticos también se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tales como el modelo murino IDCg, ratones transgénicos o ratones atímicos con xenoinjertos humanos, y otros modelos animales, tales como hámsters, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher). Los modelos animales preferentes son modelos de xenoinjertos en ratones. Las líneas celulares tumorales que se pueden usar como una fuente para los tumores de xenoinjerto incluyen, pero no están limitadas a, células SKBR3 y MCF7, que pueden proceder de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto receptores de prolactina como de erbB2. Las células SKBR3 se han usado de manera rutinaria en la técnica como modelos tumorales de xenoinjerto y ADCC. Alternativamente, se pueden usar células OVCAR3 procedentes de un adenocarcinoma de ovario humano como una fuente para tumores de xenoinjerto.

Los agentes terapéuticos de la invención se someten a prueba preferentemente *in vitro*, y entonces *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Se pueden cribar los agentes terapéuticos y métodos usando células de un tumor o una línea celular maligna. Se pueden usar muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, se puede someter a ensayo la proliferación celular midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul de tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en cambios en la morfología, crecimiento disminuido y/o formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en la membrana basal tridimensional o preparación de la matriz extracelular, etc.

Se pueden usar los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes terapéuticos para uso en seres humanos. La dosificación de dichos agentes se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas en circulación que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logre una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

D. OTROS MÉTODOS

D1. Tratamiento génico

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican las moléculas de la invención se pueden administrar para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, a modo de tratamiento génico. El tratamiento génico se refiere al tratamiento realizado mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos producen su proteína de fusión o anticuerpo codificado que media un efecto terapéutico o profiláctico. Se puede usar cualquier método para el tratamiento génico disponible en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos, por ejemplo, en Goldspiel et al. (1993) *Clinical*

Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu (1991) *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev (1993) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) *Science* 260:926-932; y Morgan y Anderson (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217.

En un aspecto preferente, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, diacuerpo o proteína de fusión de la invención, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterógenos, ligados de manera funcional a la región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otro modo de realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, como se describe en Koller y Smithies (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 86:8932-35; y Zijlstra et al. (1989) *Nature* 342:435-438.

La administración de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores portadores de ácidos nucleicos, o bien indirecta, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, entonces se trasplantan en el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como tratamiento génico *in vivo* o *ex vivo*.

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se puede administrar *in vivo*, en el que se expresa para producir el polipéptido codificado. Esto se puede efectuar mediante cualquiera de numerosos métodos, tal como mediante infección usando vectores retrovíricos u otros vectores víricos (como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.980.286; Miller et al. (1993) *Meth. Enzymol.* 217:581-599; Salmons y Gunzberg (1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141; Grossman y Wilson (1993) *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114; Kozarsky y Wilson (1993) *Current Op. in Genetics and Dev.* 3:499-503; Walsh et al. (1993) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300; Bout et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:3-10; Boesen et al. (1994) *Biotherapy* 6:291-302; Clowes et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein et al. (1994) *Blood* 83:1467-1473; y la patente de EE.UU. n.º 5.436.146), mediante inyección directa de ADN desnudo, mediante el uso del bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un cañón de genes), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o mediante su administración ligados a un péptido que se sabe que penetra en el núcleo o ligados a un antígeno sujeto a endocitosis mediada por receptor (como se describe, por ejemplo, en Wu y Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432; Joliot et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 88:1864-1868; documentos WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221) (que se puede usar para dirigirlos a tipos celulares que expresan específicamente los receptores).

Se puede introducir un ácido nucleico en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante, por ejemplo, como se describe en el documento WO 94/08598; Rheinwald (1980) *Meth. Cell Bio.* 21A:229; Pittelkow y Scott (1986) *Mayo Clinic Proc.* 61:771; Stemple y Anderson (1992) *Cell* 7 1:973-985. Las células recombinantes resultantes se pueden administrar a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Los glóbulos sanguíneos recombinantes (por ejemplo, células progenitoras o madre hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células concebidas para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y se puede determinar por un experto en la técnica. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico con propósitos de tratamiento génico engloban cualquier tipo celular deseado disponible e incluyen, pero no están limitadas a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, hepatocitos; glóbulos sanguíneos, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células progenitoras o madre, en particular células progenitoras o madre hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc. En un modo de realización preferente, la célula usada para el tratamiento génico es autógeno del sujeto.

D2. Tratamiento con vacunas

Se pueden usar los anticuerpos de la invención para inducir una respuesta inmunitaria frente a un agente inmunogénico o antigénico, incluyendo pero no limitados a, antígenos del cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas. Las composiciones de vacuna comprenden uno o más agentes inmunogénicos o antigénicos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria, en las que se recubre uno o más agentes inmunogénicos o antigénicos con un anticuerpo de la invención. Las composiciones de vacuna son particularmente eficaces en suscitar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora frente al agente inmunogénico o antigénico, que puede ser un virus frente al que se desea una respuesta inmunitaria, o un antígeno procedente de otros patógenos víricos o no víricos.

También se describen virus o células patógenas, preferentemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo en su superficie. También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición de la invención. Preferentemente una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente inmunogénico o antigénico recubierto con un anticuerpo de la invención.

D3. Dirigir liposomas u otros microportadores y nanoportadores

En algunos modos de realización, se pueden usar los anticuerpos de la invención para preparar liposomas dirigidos para administrar una composición terapéutica deseada (por ejemplo, agentes antineoplásicos) a una célula diana. La preparación y uso de inmunoliposomas para la administración dirigida de fármacos antitumorales se analiza en Mastrobattista et al. (1999) *Advanced Drug Delivery Reviews* 40:103-127. Los liposomas son estructuras vesiculares basadas en bicapas lipídicas. Pueden ser tan pequeñas como de 20 nm y tan grandes como de 10 µm de diámetro. Pueden ser unilaminares (únicamente una bicapa rodea un núcleo acuoso) o multilaminares (dos o más bicapas orientadas concéntricamente alrededor de un núcleo acuoso). En la técnica es bien conocido dirigir liposomas usando una variedad de agentes dirigidos (por ejemplo, los anticuerpos de la invención). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.957.773 y 4.603.044. Se pueden usar métodos estándar para acoplar agentes dirigidos a liposomas. Se pueden construir liposomas dirigidos con anticuerpos usando, por ejemplo, liposomas que incorporan la proteína A. (Renneisen et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:16337-16342; y Leonetti et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 87:2448-2451).

En un modo de realización preferente, los liposomas se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está generalmente dictada por la consideración, por ejemplo, del tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Están disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka, et al. (1980) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; las patentes de EE.UU. n.º 4.235.871; 4.501.728; y 4.837.028. Un método produce vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un sistema de disolventes o disolvente orgánico adecuado y se secan a vacío o un gas inerte para formar una película lipídica delgada. Si se desea, se puede redisolverse la película en un disolvente adecuado, tal como *tert*-butanol, y entonces liofilizar para formar una mezcla lipídica más homogénea que esté en una forma similar a polvo más fácilmente hidratada. Esta película se cubre con una solución acuosa del fármaco diana y el componente diana (anticuerpo) y se deja que se hidrate, típicamente durante un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaños de las vesículas multilaminares resultantes se puede desplazar hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizantes, tales como desoxicolato.

D4. Inmunoanálisis

Se pueden usar los anticuerpos de la invención para detectar el complejo BCR, BCR, CD79a, CD79b o células que expresan dichas moléculas. Se pueden usar cualquiera de un número de métodos para lograr dicha detección. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de unión inmunológicos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4,837,168). Para un análisis de los inmunoanálisis generales, véase también Asai (ed. 1993) *Methods in Cell Biology* Vol. 37, Academic Press, Nueva York; Stites y Terr (eds. 1991) *Basic and Clinical Immunology* 7.^a Ed.

Por tanto, también se describen métodos para detectar células que expresan BCR y proteínas asociadas. En un método, se realiza una biopsia en el sujeto y el tejido obtenido se somete a prueba *in vitro*. Entonces, se pone en contacto el tejido o células del tejido con un anticuerpo de la invención. Cualquier inmunocomplejo que resulte indica la presencia de una proteína diana en la muestra de biopsia. Para facilitar dicha detección, el anticuerpo se puede radiomarcarse o acoplar a una molécula efectora que sea un marcador detectable, tal como un radiomarcador. En otro método, las células se pueden detectar *in vivo* usando sistemas de formación de imágenes típicos. Entonces, se determina la localización del marcador mediante cualquiera de los métodos conocidos para detectar el marcador. Se puede usar un método convencional para visualizar el diagnóstico por la imagen. Por ejemplo, se pueden usar isótopos paramagnéticos para usar para RMN. La internalización del anticuerpo puede ser importante para prolongar la vida en el organismo más allá de la proporcionada por la unión extracelular, que es susceptible a aclaramiento por el entorno enzimático extracelular acoplado con un aclaramiento circulatorio. También se pueden detectar proteínas de BCR usando métodos de inmunoanálisis y los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, los métodos estándar incluyen radioinmunoanálisis, métodos inmunocromatográficos, inmunoanálisis de tipo sándwich (incluyendo ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, inmunoelectrotransferencia, cromatografía de afinidad (ligando de afinidad unido a una fase sólida) y detección *in situ* con anticuerpos marcados.

La aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específico pertenece a las capacidades de un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas contenidas en el presente documento. Una vez descrita generalmente la invención, se entenderá más fácilmente la misma a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Ejemplo 1

El análisis de resonancia por plasmones superficiales en un instrumento Biocore 3000 se realizó para analizar el efecto de diferentes sustituciones de aminoácido en la posición 435 de ch4420 sobre la unión a hFcRn. Los cambios en las respuestas de unión en tiempo real a hFcRn se analizaron comparativamente con Fc natural del anticuerpo

ch4420 que se capturó en la superficie de proteína-FITC al nivel de aproximadamente 500 UR. Se analizaron tres variantes (H435K, H435R y H435Q) y anticuerpos ch4420 naturales. La inyección de sobrenadantes que contienen variantes de ch4420 estuvo seguida por inyección de hFcRn a una concentración 500 nM en tampón de acetato de Na que contiene NaCl 150 mM y P-20 al 0,005 %, pH 6,0 a un caudal de 10 µl/min. La superficie de proteína-FITC se regeneró por 10 mM de glicina a pH 1,5 entre dos mutantes diferentes. Los resultados, mostrados en la figura 1, indican que los Fc mutantes con sustituciones de His a R y Q retenían la unión casi natural a hFcRn, pero que la sustitución de His a K aumentaba significativamente la respuesta de unión (hasta 4 veces).

Ejemplo 2

El análisis de resonancia por plasmones superficiales en un instrumento Biocore 3000 se realizó para analizar el efecto de diferentes sustituciones de aminoácido en la posición 435 de ch4420 sobre la dependencia del pH de la unión de hFcRn al mutante ch4420 capturado en la superficie de proteína-FITC. Se demostró la dependencia del pH de la unión a hFcRn en dos experimentos separados realizados en condiciones similares en tampón de acetato de sodio (pH 6,0) y tampón HEPES (pH 7,4). La inyección de sobrenadantes que contienen variantes de ch4420 estuvo seguida por inyección de hFcRn a una concentración 500 nM en tampón acetato de Na 20 mM que contiene NaCl 150 mM y P-20 al 0,005 %, pH 6,0, o tampón HEPES 20 mM que contiene NaCl 150 mM y pH P-20 al 0,005 %, pH 7,4, a un caudal de 10 µl/min. La superficie de proteína-FITC se regeneró mediante 10 mM de glicina a pH 1,5 entre la captura de dos mutantes diferentes. La curva de inyección del tampón se restó como blanco sin analito. Los resultados, mostrados en la figura 2 y la figura 3, indican que el Fc mutante con sustitución de His a K mostraba una unión mejorada a FcRn a pH inferior a 6,5 (el pH era 6,0), y que la unión a FcRn se anuló completamente a pH 7,4 al nivel de mutantes que no se unen con la sustitución V. La figura 2 representa la unión a pH 6,0, y la figura 3 representa la unión a pH 7,4.

Ejemplo 3

Se realizó un análisis de resonancia por plasmones superficiales en un instrumento Biocore 3000 para analizar el efecto de la sustitución de aminoácido H435K en ch4420 sobre la unión a FcRn humano soluble (shFcRn). Los anticuerpos ch4420 de Fc natural y Fc mutante se capturaron en la superficie con mlgG1-Flrscn inmovilizado, y se inyectó shFcRn a una concentración de 400 nM. Cuatro variantes (K288D, N434A, H435K, K288D y H435K), un mutante YTE (triple sustitución de M252Y, S254T y T256E; Dall'Acqua, WF et al. (2002) "Increasing The Affinity Of A Human IgG1 For The Neonatal Fc Receptor: Biological Consequences," J. Immunol. 169(9):5171-5180; Petkova, S.B. et al. (publicación electrónica de 31 de octubre de 2006) "Enhanced Half-Life Of Genetically Engineered Human IgG1 Antibodies In A Humanized FcRn Mouse Model: Potential Application In Humorally Mediated Autoimmune Disease," Int. Immunol. 18(12):1759-1769), y los anticuerpos ch4420 naturales se analizaron. La figura 4 representa un análisis de SPR de unión de shFcRn (400 nM) a Fc ch4420 mutante capturado en la superficie con mlgG1-Flrscn inmovilizado. Se analizaron cinco variantes (K288D/H435K; H435K; K288D; N434A y el mutante YTE (triple sustitución de M252Y, S254T y T256E) y los anticuerpos ch4420 naturales. Los resultados mostrados en la figura 4 indican que los mutantes de Fc que tienen la sustitución H435K y la combinación de sustituciones K288D y H435K tenían una unión significativamente mejorada en comparación con la unión natural con las variantes K288D/H435K e YTE que tienen la mejor unión.

Ejemplo 4

El análisis de resonancia por plasmones superficiales en un instrumento Biocore 3000 se realizó para analizar el efecto de diferentes sustituciones de aminoácido sobre la capacidad de ch4420 de unirse a diferentes FcγR (FcγRIIIA (CD16A); FcγRIIA (CD32A); FcγRIIB (CD32B)), capturados en la superficie de BSA-Flrscn (se usó seroalbúmina bovina (BSA) como referencia). Se analizaron cuatro variantes (K288D/H435K; N434A; H435K; y el mutante YTE (triple sustitución de M252Y, S254T y T256E) y los anticuerpos ch4420 naturales. Los anticuerpos ch4420 mutantes se capturaron al nivel de 700-1000 UR en la superficie con BSA-Flrscn inmovilizado. Se inyectaron FcγR a un caudal de 20 µl/min durante 60 segundos, seguido de una adición de solución de regeneración (etanolamina 1 M, pH 8,5) para la disociación completa del receptor. La superficie de BSA-Flrscn se regeneró mediante una inyección de adición de glicina 10 mM, pH 1,5. Las respuestas de unión para cada conjunto de FcγR se normalizaron al nivel capturado de anticuerpo natural. Los resultados del análisis, mostrados en la figura 5, paneles A-E, indican que la variante de Fc K288D/H435K y la variante de Fc N434A mostraban cada una una unión potenciada a CD16A y una unión sustancialmente equivalente a CD32A y CD32B (en comparación con ch4420 de Fc natural). La variante de Fc H435K mostró unión a CD16 y a CD32A y CD32B que era equivalente a la de ch4420 con Fc natural. El mutante YTE (sustitución triple de M252Y, S254T y T256E) mostró una unión disminuida a CD16, CD32A y CD32B en comparación con ch4420 de Fc natural.

Ejemplo 5

Se realizó un análisis de resonancia por plasmones superficiales en un instrumento Biocore 3000 para analizar la capacidad de tres mutantes diferentes de ch4420 de unirse a CD16A, CD32A y CD32B:

- MGFc316 - una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de H435K;
 - 5 • MGFc317 - una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L además de K288D y H435K; y
 - MGFc318 - una variante de Fc 4D5 que tiene las sustituciones F243L, R292P e Y300L además de K288D y H435K.
- 10 Los resultados del análisis, que se muestran en la figura 6, paneles A-E , indican que las tres variantes de Fc mostraron una unión potenciada a CD16A. Se encontró que MGFc316 y MGFc317 muestran unión potenciada a CD32A y CD32B. Se encontró que MGFc318 mostraba una unión disminuida a CD32B y CD32A R131G2agl, y una unión equivalente a CD32B H131G2agl.
- 15 La figura 7 representa un análisis de SPR de la unión de estos mutantes de ch4420 (y MGFc315 (K288D/H435K) a FcRn. Los mutantes de ch4420 se capturan en una superficie con proteína-Flrscn inmovilizada, las respuestas de SPR a pH 6,0 se normalizan al mismo nivel de anticuerpo. Los resultados muestran que los cuatro mutantes sometidos a prueba mostraron una unión potenciada a FcRn.
- 20 **Ejemplo 6**
- Se investigó la cinética de unión entre FcRn y diferentes mutantes de ch4420. Se inyectó sFcRn humano sobre las variantes de ch4420 N434A y MGFc315 (K288D/H435K) capturadas a un nivel de aproximadamente 1000 UR en mIgG1-Flrscn inmovilizado en un intervalo de concentración de 0,63-1,00 μ M. La inyección de tampón se restó como
- 25 blanco sin analito. Las respuestas de unión se normalizaron al mismo nivel de anticuerpo capturado y se analizaron mediante los modelos de Langmuir 1:1 (panel superior) y de afinidad en equilibrio (panel inferior). Los resultados de esta investigación se muestran para la forma natural en la figura 8A (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8B (modelo de afinidad en equilibrio), para la variante de ch4420 N434A en la figura 8C (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8D (modelo de afinidad en equilibrio) y para MGFc315 en la figura 8E (modelo de Langmuir 1:1) y la figura 8F (modelo de afinidad en equilibrio). Los resultados muestran que la variante de ch4420 MGFc315 tenía una KD menor que la
- 30 de N434A o la e Fc natural.
- Ejemplo 7**
- 35 Se investigó la capacidad de diferentes variantes de ch4420 K288 de unirse a FcRn. Las variantes en las que K288 se había sustituido por C, D, E, F, G, H, I, L, N, Q, R, S, T, V, W e Y se capturaron en una superficie con proteína-Flrscn inmovilizada y en contacto con hFcRn 500 nM. El análisis de unión de SPR de estos mutantes de ch4420 y de N286K, H435K y la forma natural se muestran en la figura 9A y en la figura 9B.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un dominio Fc variante, en el que dicho dominio Fc variante posee una
 5 secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc natural porque no
 comprende más de 15 modificaciones de residuos de aminoácido con respecto a dicho dominio Fc natural,
 comprendiendo dichas modificaciones de residuos de aminoácido una sustitución de una lisina en el residuo
 435 de Kabat y una sustitución de ácido aspártico en el residuo 288 de Kabat, en el que:
- 10 i) dicho dominio Fc variante es un dominio Fc de IgG1 humana variante y dicho dominio Fc natural es un
 dominio Fc de IgG1 humana;
- ii) dicho dominio Fc variante es un dominio Fc de IgG2 humana variante y dicho dominio Fc natural es un
 dominio Fc de IgG2 humana;
- 15 iii) dicho dominio Fc variante es un dominio Fc de IgG3 humana variante y dicho dominio Fc natural es un
 dominio Fc de IgG3 humana; o
- iv) dicho dominio Fc variante es un dominio Fc de IgG4 humana variante y dicho dominio Fc natural es un
 20 dominio Fc de IgG4 humana;
- y en el que dicho dominio Fc variante muestra:
- (A) afinidad de unión potenciada de dicho dominio Fc de dicho polipéptido por FcRn humano al menos 2
 25 veces con respecto a la afinidad de unión mostrada por una molécula comparable a FcRn humano si
 comprende dicho dominio Fc natural; o
- (B) semivida en suero potenciada de dicho polipéptido en seres humanos de al menos 1,5 veces en
 comparación con la semivida en suero de dicho polipéptido en seres humanos si comprende dicho dominio
 30 Fc natural.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho dominio Fc variante de dicho polipéptido:
- (A) muestra unión potenciada a FcRn humano a un pH inferior a 6,5, en comparación con dicho dominio Fc
 35 natural;
- (B) muestra mayor afinidad de unión a FcRn humano, en comparación con dicho dominio Fc natural; o
- (C) potencia la semivida en suero de dicho polipéptido.
- 40 3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido es una cadena pesada
 de IgG1.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho dominio Fc variante es un
 45 dominio Fc humano quimérico, humanizado o variante.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho dominio Fc variante de dicho
 polipéptido comprende al menos una modificación de aminoácido además de una lisina en el residuo 435 de
 Kabat y un ácido aspártico en el residuo 288 de Kabat.
- 50 6. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicha modificación adicional comprende:
- (A) al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F243L, D270E, R292P, S298N, Y300L,
 V305I, A330V y P396L;
- 55 (B) al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L y P396L; F243L y R292P; y
 R292P y V305I;
- (C) al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P e Y300L; F243L,
 R292P y V305I; F243L, R292P y P396L; y R292P, V305I y P396L;
- 60 (D) al menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P, Y300L y P396L; y
 F243L, R292P, V305I y P396L; o
- (E) al menos las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.
- 65

7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dichas modificaciones de aminoácido de dicho dominio Fc variante alteran la función efectora mediada por dicho dominio Fc.
- 5 8. El polipéptido de la reivindicación 7, en el que la función efectora alterada es una función de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) potenciada o una función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) potenciada.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que dichas modificaciones de aminoácido a dicho dominio Fc:
- 10 (A) aumentan la unión de dicho dominio Fc a un FcγR activador;
- (B) aumentan la unión de dicho dominio Fc a FcγRIIB; o
- 15 (C) disminuyen la unión de dicho dominio Fc a FcγRIIB.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho polipéptido comprende adicionalmente un agente terapéutico.
- 20 11. El polipéptido de la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido comprende:
- (A) un anticuerpo monocatenario;
- (B) un diacuerpo; o
- 25 (C) una cadena polipeptídica de un anticuerpo, o de un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F(ab) de un anticuerpo.
12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno tumoral o a un antígeno relacionado con patógenos.
- 30 13. El polipéptido de la reivindicación 12, en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en 17-1A, αvβ3, AFP, complejo BCR, CA125, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, proteínas asociadas al ADN, receptor de EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2/neu, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-1, nuC242, antígeno PEM, antígeno SK-1, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF; o en el que el antígeno relacionado con patógenos es un antígeno de viruela, un antígeno del virus del Nilo Occidental, un antígeno del carbunco, un antígeno de la meningitis bacteriana, un antígeno del cólera, un antígeno de *Clostridium difficile*, un antígeno de la enfermedad de Lyme, un antígeno de *Pasteurella pestis*, un antígeno neumocócico, un antígeno estreptocócico, un antígeno de *Clostridium tetani*, un antígeno microcócico o un antígeno de tularemia.
- 35 40 14. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 45 15. Uso del polipéptido de la reivindicación 13 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno tumoral.
16. El polipéptido de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno tumoral.
- 50 17. Uso del polipéptido de la reivindicación 13 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno relacionado con patógenos.
18. El polipéptido de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa, en el que dicho polipéptido se une a un antígeno relacionado con patógenos.
- 55 19. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

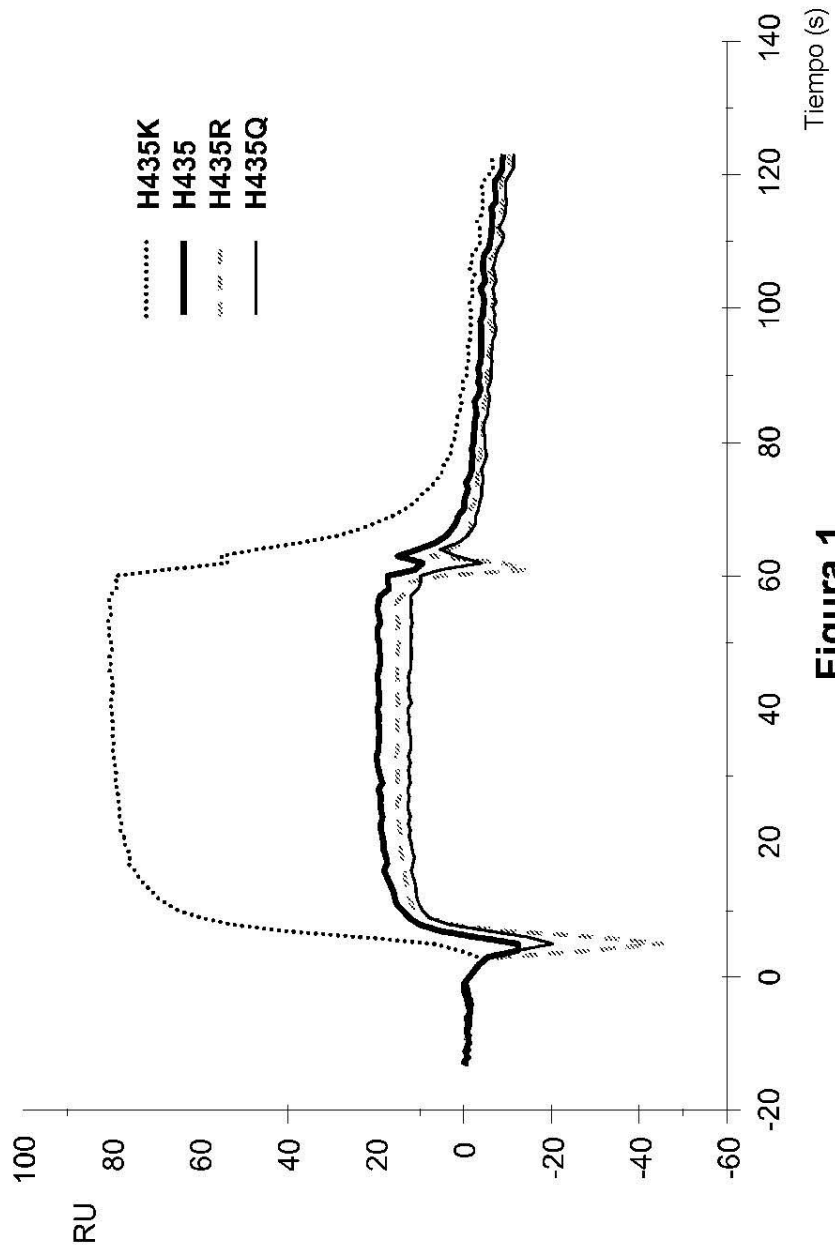


Figura 1

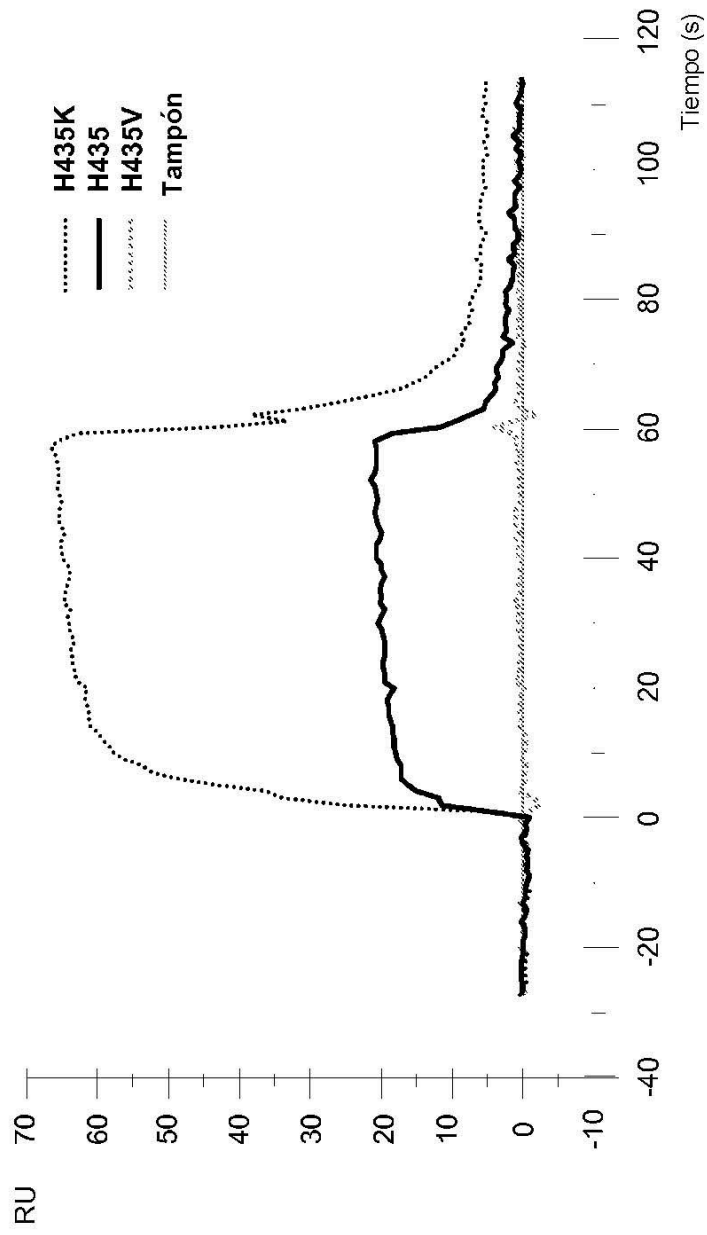


Figura 2

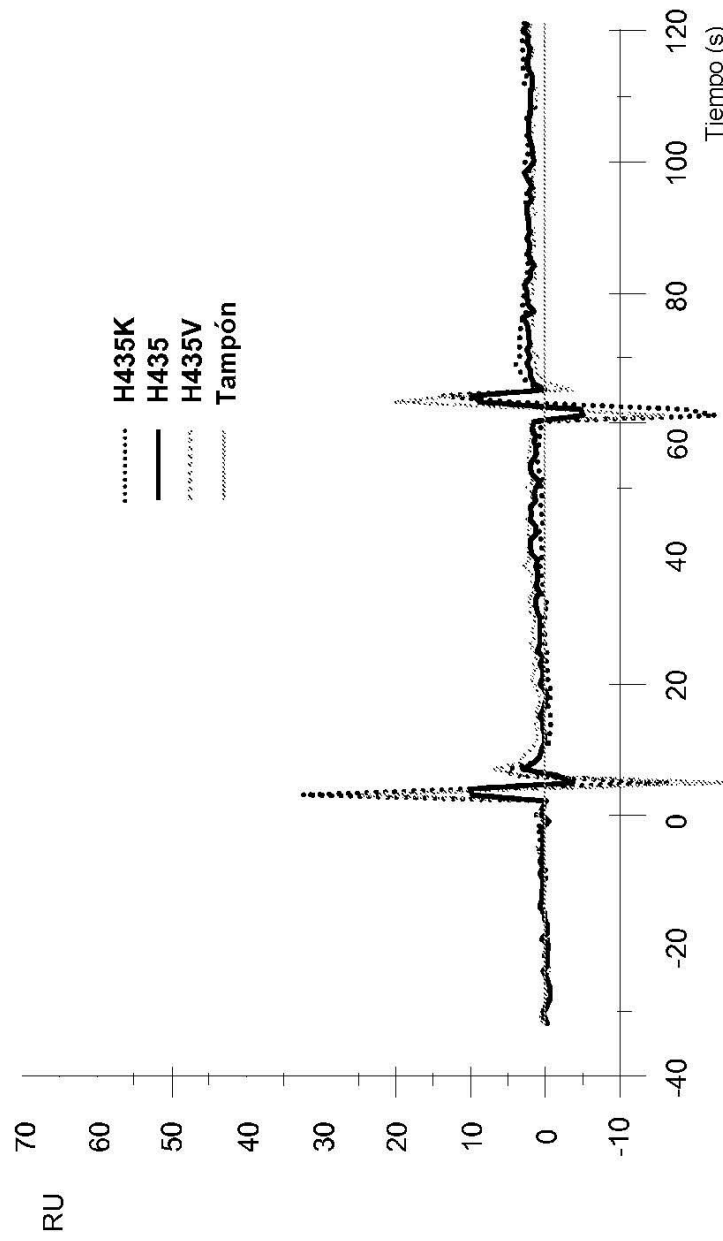


Figura 3

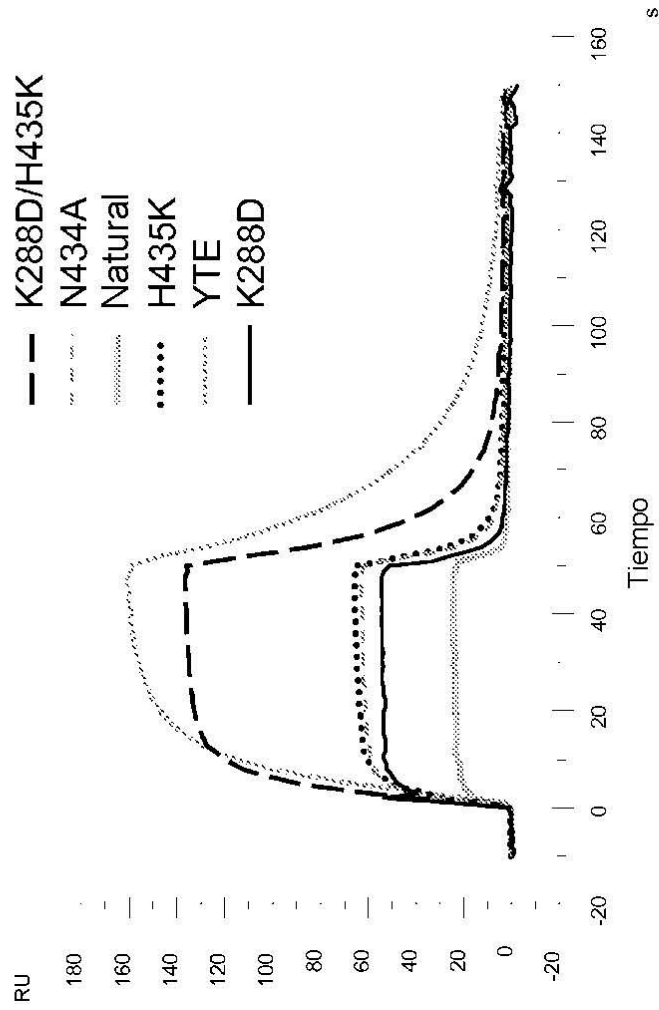


Figura 4

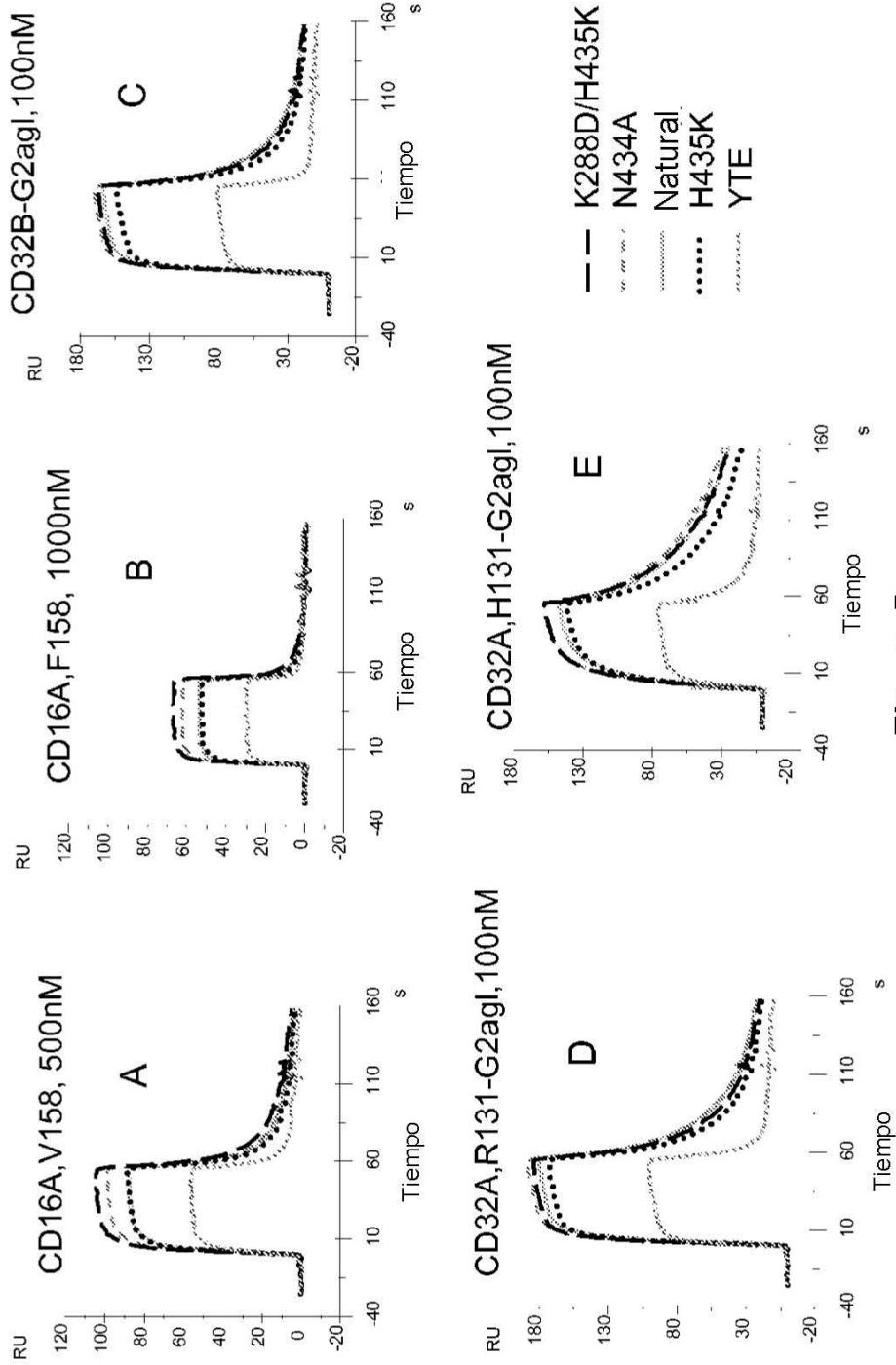


Figura 5

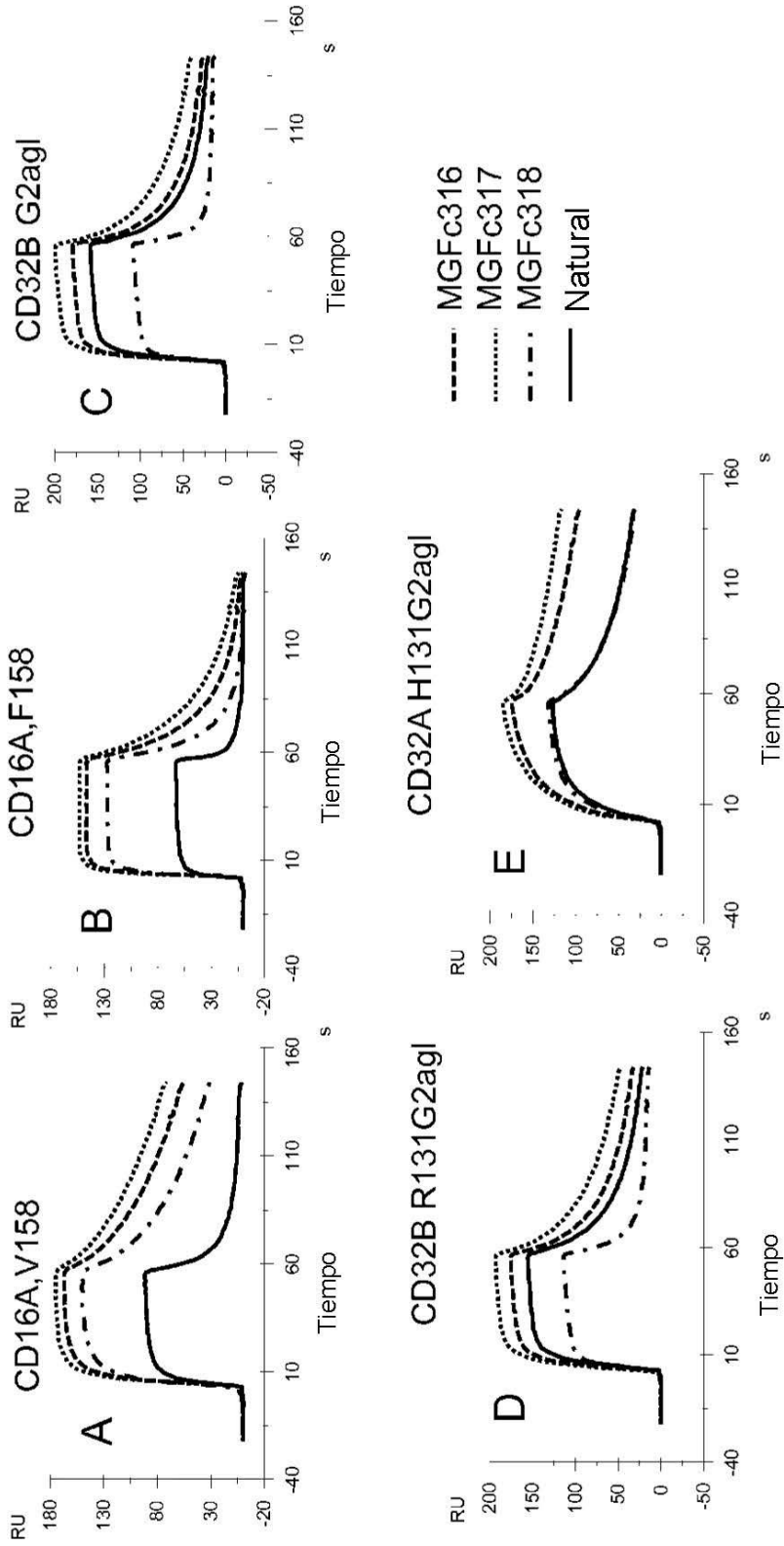


Figura 6

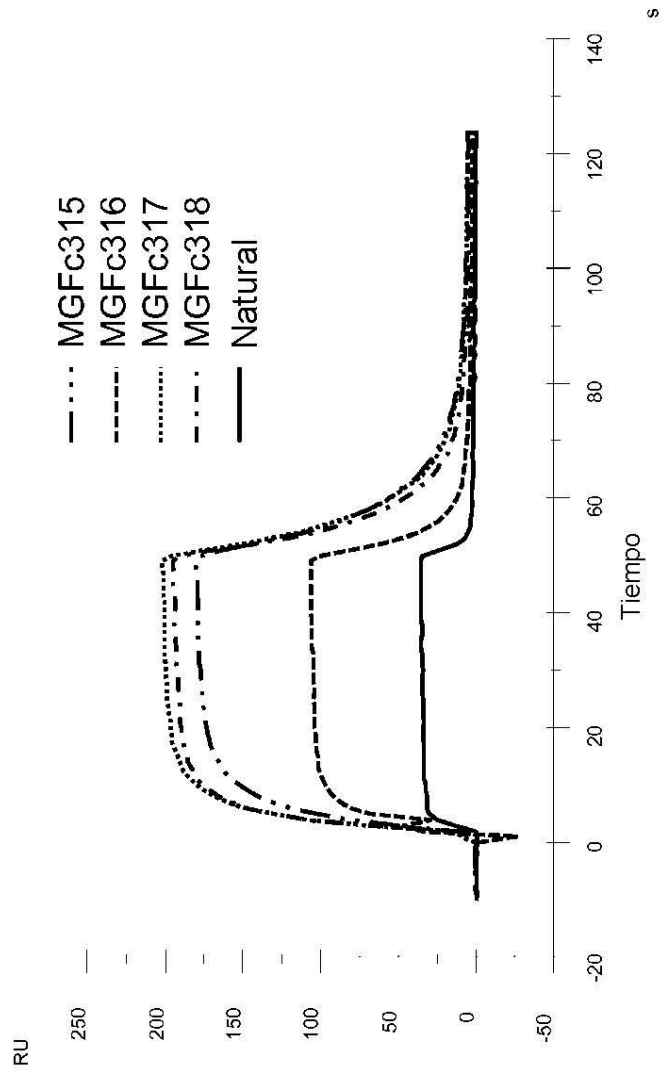


Figura 7

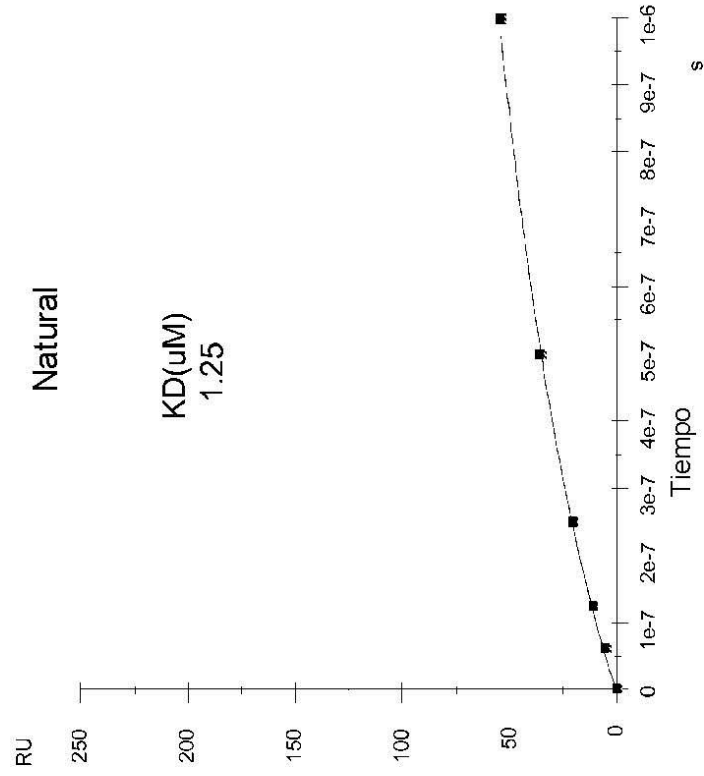


Figura 8B

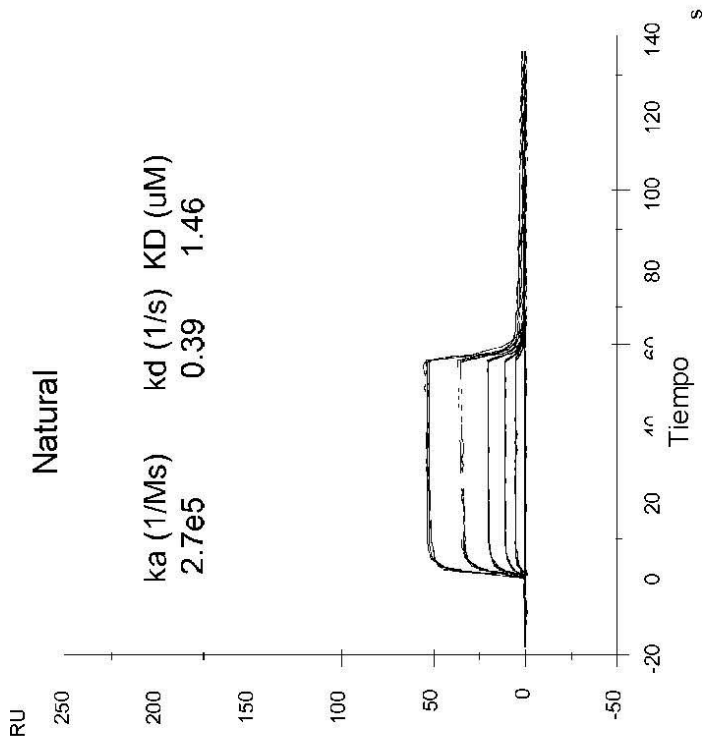


Figura 8A

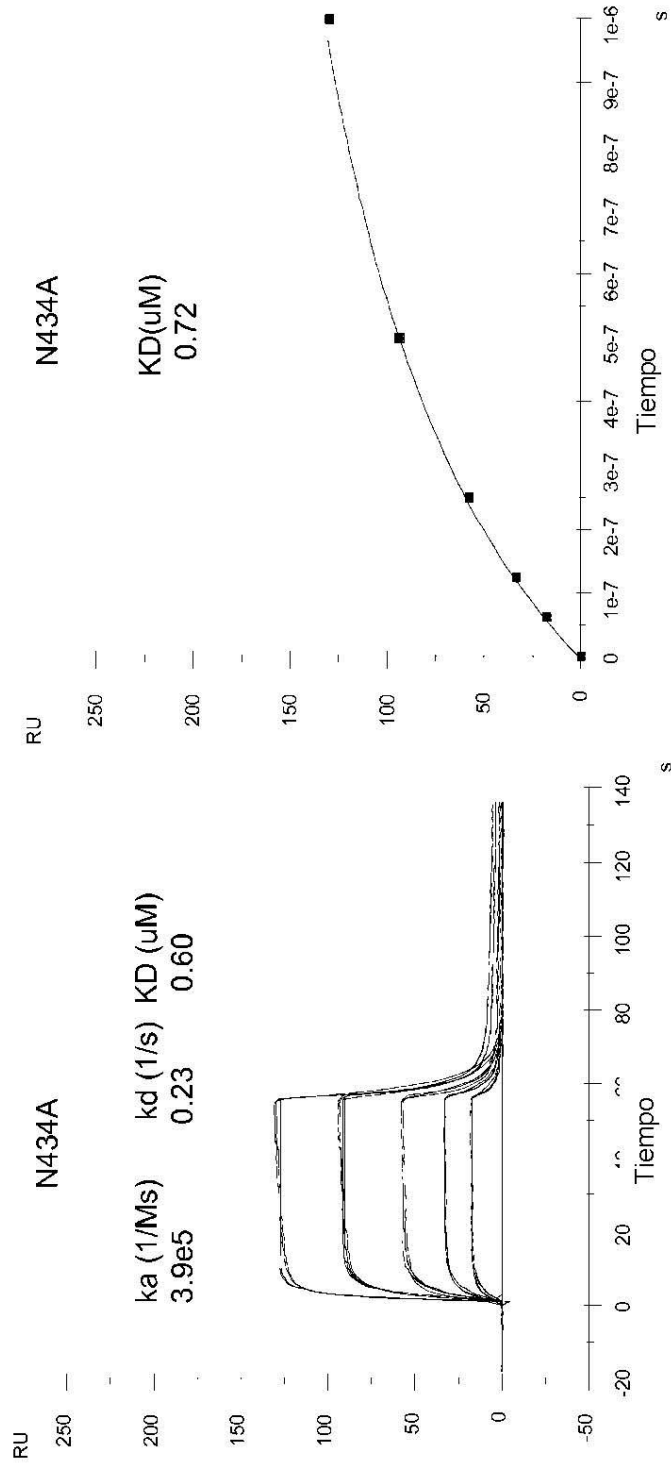


Figura 8D

Figura 8C

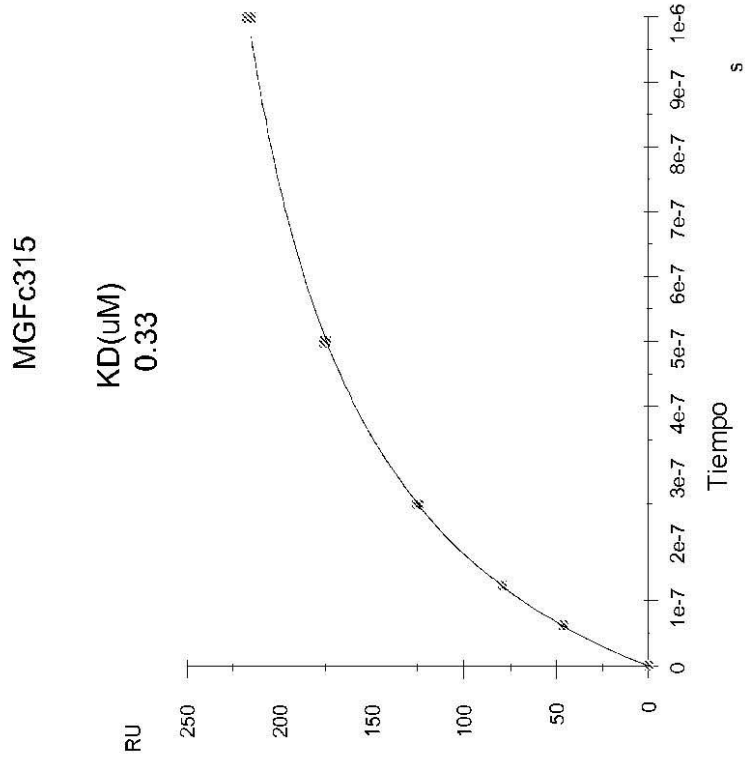


Figura 8F

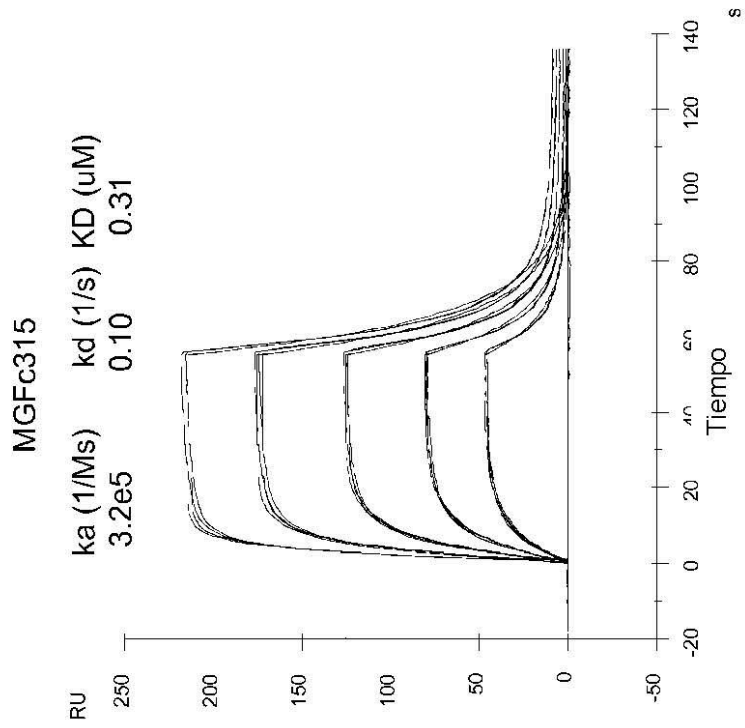


Figura 8E

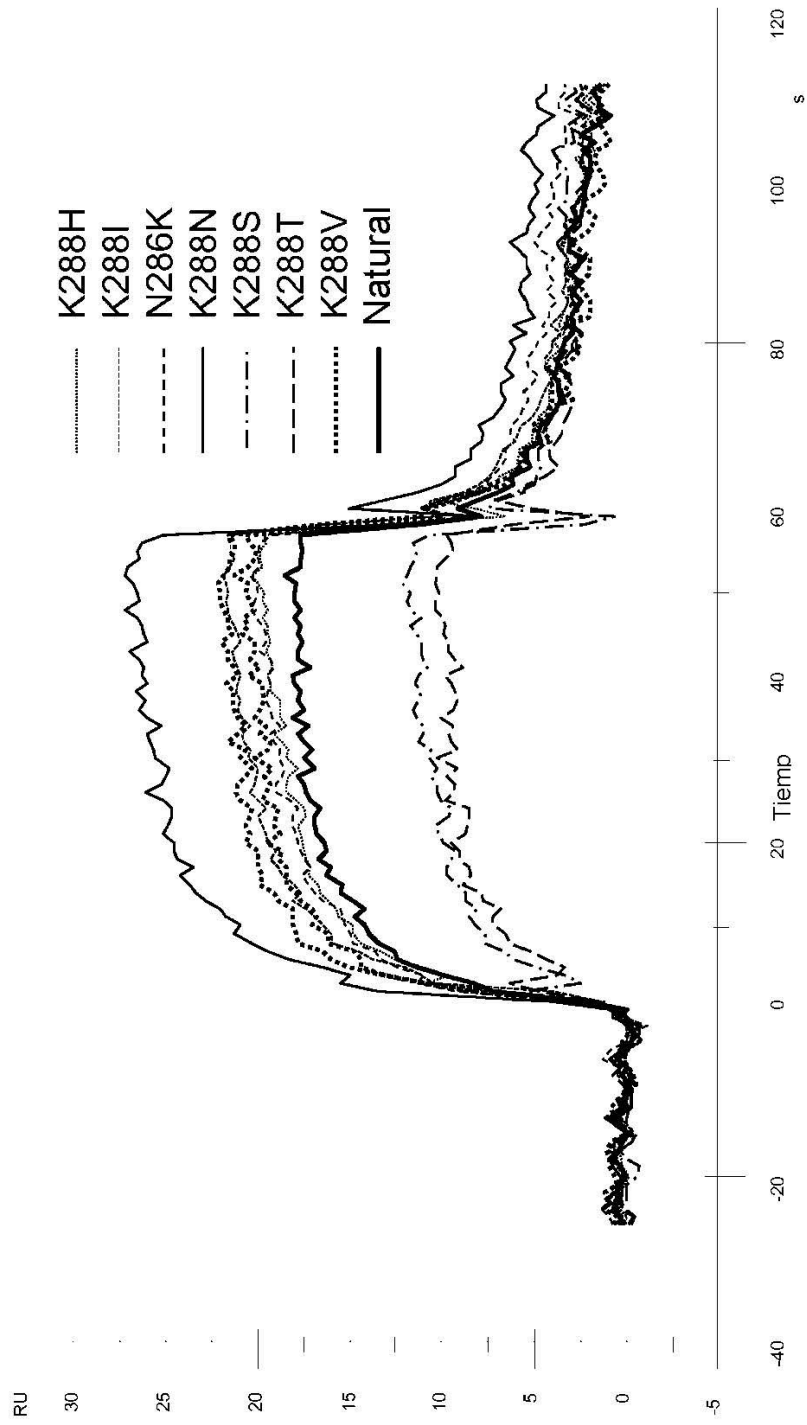


Figura 9A

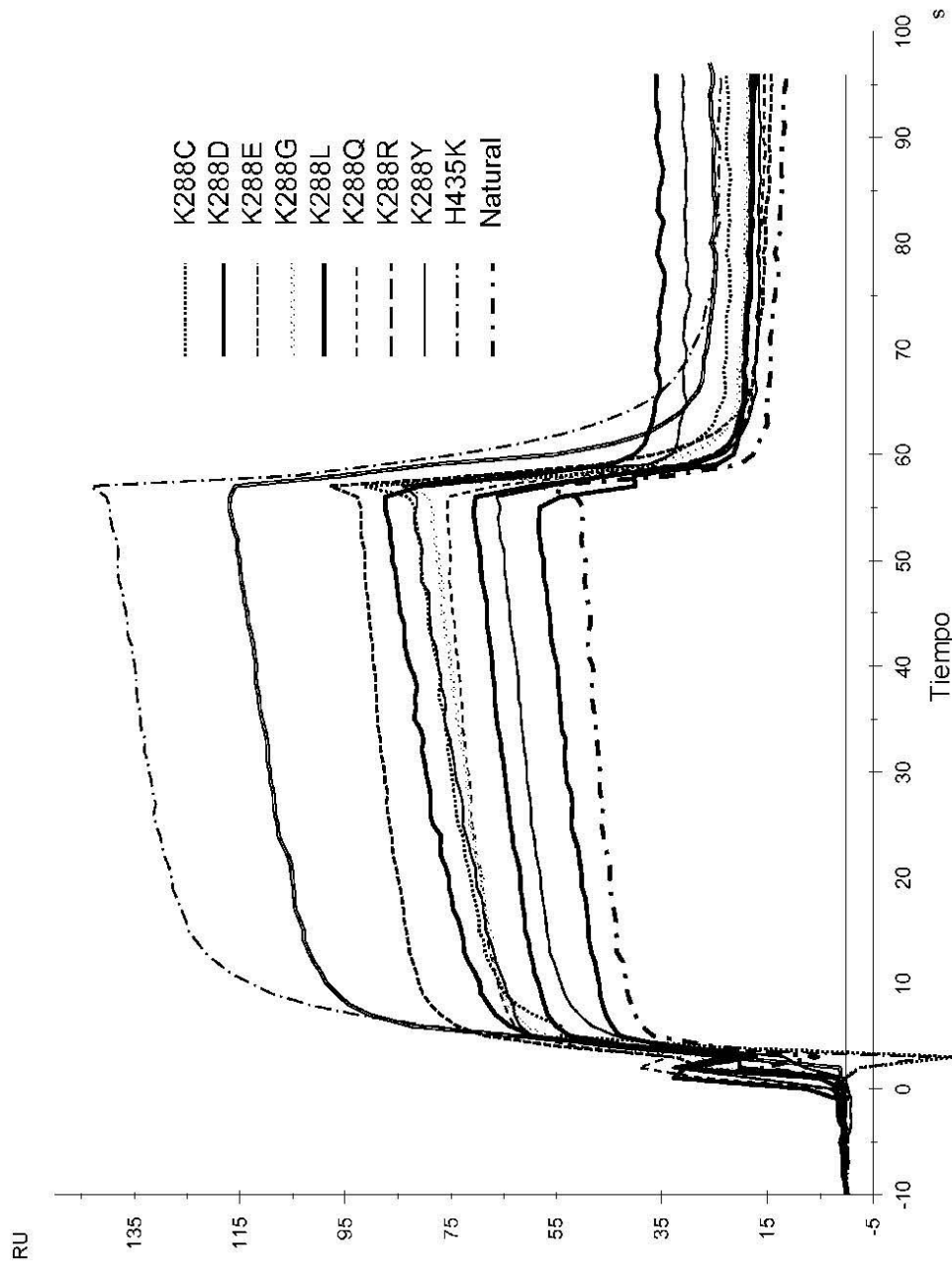


Figura 9B