

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 031**

51 Int. Cl.:

B01D 15/38 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/EP2013/052932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13704599 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2814587**

54 Título: **Cromatografía de afinidad basada en el receptor Fc**

30 Prioridad:

15.02.2012 EP 12155630

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

16.07.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FALKENSTEIN, ROBERTO;
HERTENBERGER, HUBERT;
RUEGER, PETRA y
SCHLOTHAUER, TILMAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 676 031 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

Cromatografía de afinidad basada en el receptor Fc

- 5 En el presente documento se informa del uso de una columna de cromatografía de afinidad que comprende el receptor Fc neonatal humano inmovilizado como ligando de afinidad.

Antecedentes

- 10 Una inmunoglobulina comprende, en general, los dos llamados polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera) y los dos llamados polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera contiene un dominio variable (región variable) (en general, la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que pueden interaccionar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera comprende una región constante (en general, la porción carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) a las células que tienen un receptor Fc gamma (FcγR), tales como las células fagocíticas, o ii) a las células que tienen el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como el receptor Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo los factores del sistema del complemento clásico, tales como el componente (C1q).
- 15 El receptor Fc neonatal (FcRn) también se conoce como el receptor relacionado con el CPH de clase I (para un análisis, véase Ward, E.S. y Ober, R.J., *Advances in Immunology* 103 (2009) 77-115). Los estudios no solo han demostrado que este receptor sirve para regular los niveles de IgG y su distribución durante la vida adulta (Ghetie, V., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 637-640; Israel, E.J., *Immunology* 89 (1996) 573-578; Junghans, R.P. y Anderson, C.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5512-5516), sino que también desempeña otras múltiples funciones en diversos tipos de células y tejidos (véase, por ejemplo, Akilesh, S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 967-972; Dickinson, B.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 903-911; Kim, H., *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 2025-2029; Spiekermann, G.M., *et al.*, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 303-310; Zhu, X., *et al.*, *J. Immunol.* 166 (2001) 3266-3276). Se han aislado ortólogos de FcRn de muchas especies, incluyendo ratón, rata, ser humano, oveja, vaca, zarigüeya, cerdo y camello (Adamski, F.M., *et al.*, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 435-444; Ahouse, J.J., *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 6076-6088; Kacsokovics, I., *et al.*, *J. Immunol.* 164 (2000) 1889-1897; Kacsokovics, I., *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 30 (2006) 1203-1215; Kandil, E., *et al.*, *J. Immunol.* 154 (1995) 5907-5918; Mayer, B., *et al.*, *Immunology* 107 (2002) 288-296; Schnulle, P.M. y Hurley, W.F., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91 (2003) 227-231; Simister, N.E. y Mostov, K.E., *Nature* 337 (1989) 184-187; Story, C.M., *et al.*, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 2377-2381), lo que indica que este receptor está presente esencialmente en todas las especies de mamíferos. Las múltiples funciones del FcRn dependen de su capacidad para proteger a la IgG de la degradación lisosómica en las células y liberar la carga unida durante los acontecimientos exocíticos en la membrana plasmática (Ober, R.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 11076-11081; Ober, R.J., *et al.*, *J. Immunol.* 172 (2004) 2021-2029; Prabhat, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 5889-5894). Además, dado el potencial para modular las vías de transporte de IgG y el comportamiento *in vivo*, el informe anterior sobre la genomanipulación de anticuerpos para incrementar su semivida en ratones (Ghetie *et al.*, *supra*) se ha expandido a un área de intenso interés en la industria biofarmacéutica (Dall'Acqua, W.F., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23514-23524; Hinton, P.R., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6213-6216; Hinton, P.R., *et al.*, *J. Immunol.* 176 (2006) 346-356; Shields, R.L., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604).

- 45 En el documento WO 2005/047327 se informa de variantes de polipéptidos de unión al receptor Fc neonatal (FcRn), de proteínas de unión al Fc diméricas y de procedimientos relacionados con las mismas. En el documento WO 2006/031370 se informa de variantes de polipéptidos con una función efectora alterada. En el documento WO 2009/041643 se informa de un procedimiento de modificación del punto isoeléctrico de anticuerpos por medio de la sustitución aminoacídica en la CDR. En el documento WO 2010/048313 se informa de un FcRn recombinante y variantes del mismo para la purificación de proteínas de fusión que contienen Fc. Magistrelli, G., *et al.* informan de la producción de FcRn recombinante consistente en células de mamífero, lo que posibilita la inmovilización orientada en los estudios de unión a IgG (*J. Immunol. Meth.*, en impresión, disponible en línea desde el 12-09-2011).

- 55 La interacción entre IgG y FcRn depende estrictamente del pH y se produce en una estequiometría 1:2, uniéndose una IgG a dos moléculas de FcRn por medio de sus dos cadenas pesadas (Huber, A.H., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 230 (1993) 1077-1083).

Josic, D., *et al.*, divulgan Analytical and preparative methods for purification of antibodies (*Food Technol. Biotechnol.* 39 (2001) 215-226).

- 60 Roopenian, D.C. *et al.* divulgan FcRn - the neonatal Fc receptor comes of age (*Nat. Rev.* 7 (2007) 715-725).

Pan Hai, *et al.*, divulgan Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn (*Prot. Sci.* 18 (2009) 424-433).

65

Sumario

5 Un aspecto de la invención es el uso de un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) como ligando en cromatografía de afinidad en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal positivo para separar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una región Fc,

en el que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal y microglobulina beta 2 se une a un material de cromatografía y el complejo no covalente se conjuga con la fase sólida por medio de un par de unión específica,

10 en el que el gradiente de pH es desde un primer valor de pH a un segundo valor de pH, por lo que el primer valor de pH es desde pH 3,5 a pH 6,4 y el segundo valor de pH es desde pH 7,4 a pH 9,5, y

en el que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se monobiotinila y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.

15 Se ha descubierto que con el procedimiento/uso como se informa en el presente documento ahora es posible separar, aislar y caracterizar, con respecto a sus propiedades *in vivo*, especies de anticuerpos estrechamente relacionados, es decir, que difieren en un único residuo aminoacídico o en un número limitado.

20 Por tanto, se pueden usar las diferentes especies de anticuerpos, es decir, una diferencia de un residuo aminoacídico, aislados con el procedimiento como se informa en el presente documento, para caracterizar/identificar posiciones aminoacídicas que influyen en la semivida relacionada con FcRn.

25 Por tanto, con el procedimiento como se informa en el presente documento es posible separar diferentes variantes de un anticuerpo original y determinar la proporción específica entre estas variantes, lo que no es posible con los procedimientos conocidos actualmente, ya que estos solo proporcionan la suma de las modificaciones y no las especies individuales (es decir, para una mezcla de original y variante 1 y variante 2 y variante 1/2, la espectrometría de masas proporciona el total de las moléculas que comprenden la variante 1, es decir, variantes que comprenden una única variación (1) y también las que también comprenden la segunda variación (1/2)).

30 Esto se puede lograr mediante la combinación de i) la inmovilización sobre un soporte de cromatografía de FcRn humano producido de manera recombinante en combinación con microglobulina beta 2 humana producida de manera recombinante y ii) un gradiente de pH lineal.

35 Se ha descubierto que, para las condiciones dadas, un anticuerpo IgG1 natural tiene un tiempo de retención de aproximadamente 42 a 49 minutos. En un modo de realización, un anticuerpo o proteína de fusión a Fc que comprende una región Fc natural de la subclase IgG1 tiene un tiempo de retención de aproximadamente 45 minutos.

40 Un anticuerpo que tiene una región Fc modificada con unión al FcRn reducida tiene un tiempo de retención más pequeño, mientras que un anticuerpo que tiene una región Fc modificada con unión al FcRn potenciada tiene un tiempo de retención más grande. En un modo de realización, el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se une a una fase sólida. En un modo de realización, la fase sólida es un material de cromatografía. En un modo de realización, el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se biotinila y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.

45 En un modo de realización, la microglobulina beta 2 es de la misma especie que el FcRn.

50 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo trispecífico del polipéptido de fusión o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tetraespecífico del polipéptido de fusión.

55 Un procedimiento ejemplar como se informa en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un anticuerpo con una semivida *in vivo* predeterminada en el que se realiza una cromatografía y se selecciona un anticuerpo que tiene un tiempo de retención dentro de una ventana de tiempo de retención dada en relación con una IgG1 natural.

Breve descripción de las figuras

60 **Figura 1** Linealidad del anticuerpo aplicado y área bajo la curva de una cromatografía que usa una columna con FcRn como se informa en el presente documento.

Figura 2 Cromatograma del anticuerpo anti-IGF-1R natural y mutante YTE en la columna con FcRn como se informa en el presente documento.

65 **Figura 3** Cromatografía con FcRn (fila superior A/B/C) de diferentes preparaciones de anticuerpos que contienen diferentes cantidades de semianticuerpos como se puede ver en el análisis por CE-SDS (fila inferior A/B/C).

- Figura 4** Cromatografía con FcRn de diferentes preparaciones de anticuerpos que contienen diferentes cantidades de monómero y agregados del anticuerpo.
- 5 **Figura 5** Influencia del tiempo de retención en una cromatografía con FcRn por el número de regiones Fc en la molécula cromatografiada.
- Figura 6** Impacto de la oxidación de un anticuerpo sobre el tiempo de retención de la cromatografía con FcRn.
- 10 **Figura 7** Cromatograma del anticuerpo anti-Abeta natural y mutante HE en la columna con FcRn como se informa en el presente documento.
- Figura 8** Impacto de la oxidación en Met252 y Met428 sobre la interacción con FcRn. La aplicación de una muestra de un anticuerpo IgG1 almacenada durante 2 meses a 40 °C (curva 2) a la columna con FcRn da lugar a una especie de elución más temprana con un doble pico indicativo de un anticuerpo IgG1 oxidado, mientras que la aplicación de muestras de anticuerpo IgG1 almacenadas durante 2 meses a 25 °C (curva 1) y -80 °C (curva 3) a la columna con FcRn da lugar a picos prácticamente superpuestos de elución más tardía. Condiciones de cromatografía: tampón A (MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5), tampón B (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2), flujo 0,5 ml/min, gradiente del tampón A al tampón B: 60 min (estándar).
- 15 20 **Figura 9** Análisis por resonancia de plasmón superficial (RPS) del anticuerpo IgG1 sometido a agresión. La aplicación de una muestra del anticuerpo IgG1 almacenada durante 2 meses a 40 °C a BIAcore para su análisis por RPS muestra diferentes sensogramas para las especies de anticuerpos IgG1 natural y oxidados en Met252 y Met428.
- 25 **Figura 10** Impacto de los agregados del anticuerpo sobre la interacción con FcRn. Análisis cromatográfico de FcRn del anticuerpo anti-IL13Ralfa en la mezcla original, sus monómeros aislados y agregados aislados. Condiciones de cromatografía: tampón A (MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5), tampón B (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,8), flujo 0,5 ml/min, gradiente del tampón A al tampón B: 50 min (estándar).
- 30 **Figura 11** Análisis por RPS de los agregados del anticuerpo anti-IL13Ralfa. Sensogramas del anticuerpo anti-IL13Ralfa como patrón de referencia (curva 1), en la muestra original (3), de los monómeros del anticuerpo anti-IL13Ralfa aislados (curva 2) y los agregados del anticuerpo anti-IL13Ralfa aislados (curva 4).
- 35 **Figura 12** Impacto de las mutaciones en Fc sobre la farmacocinética en ratones transgénicos para FcRn. El anticuerpo natural o su triple mutante YTE se administraron como una única inyección i.v. rápida de 10 mg/kg a 8 animales por grupo. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar (DE), análisis ANOVA de la significación en comparación con el anticuerpo natural (+++, $p < 0,001$). A: área bajo la curva de concentración sérica-tiempo desde tiempo 0 a 672 h (ABC (0-672)). B: semivida terminal.
- 40

Descripción detallada de los modos de realización de la invención

- 45 El receptor Fc neonatal (FcRn) es importante para el destino metabólico de los anticuerpos IgG *in vivo*.
- La cromatografía de afinidad por FcRn puede diferenciar las muestras de IgG mediante su perfil de área de pico y tiempo de retención. Permite el análisis de la interacción entre FcRn e IgG *in vitro* y puede proporcionar una explicación sobre la integridad estructural y funcional de la IgG terapéutica con respecto a su farmacocinética *in vivo*.
- 50 Por tanto, la cromatografía de afinidad por FcRn de las IgG mutante y natural se puede usar como pronóstico semicuantitativo de su farmacocinética *in vivo*. Además, la cromatografía de afinidad por FcRn se puede usar para realizar un seguimiento de la interacción FcRn-IgG, por ejemplo, para la caracterización de IgG en lotes o para los estudios de comparabilidad.
- 55 Se ha descubierto un procedimiento de cromatografía de líquidos de afinidad por FcRn con un gradiente de pH estandarizado con condiciones que se asemejan estrechamente al mecanismo de interacción entre la IgG y FcRn *in vivo*. El FcRn humano se inmovilizó en la columna como ligando de afinidad y se aplicó un gradiente de pH lineal, por ejemplo, desde pH 5,5 a 8,8.
- 60 Por ejemplo, la cromatografía de afinidad por FcRn analítica permite la identificación y caracterización de muestras y variantes de IgG mediante su perfil de patrón de pico y tiempo de retención. El procedimiento puede distinguir 1) la misma IgG con diferentes fragmentos Fab, 2) formas de IgG oxidadas de formas de IgG no oxidadas, 3) agregados de monómeros y 4) anticuerpos con variaciones en la región Fc.
- 65 Se ha descubierto que los cambios en el perfil de cromatografía de afinidad por FcRn de las IgG variantes (variantes de la región Fc) en relación con la IgG natural pronostican el perfil farmacocinético *in vivo*. Estos resultados demuestran que la

cromatografía de afinidad por FcRn es un nuevo procedimiento útil para la caracterización de las interacciones FcRn-IgG, de la integridad de IgG y mayormente de una IgG como tal.

I. Definiciones

- 5 El término "aproximadamente" indica un intervalo de un +/- 20 % del siguiente valor numérico posterior. En un modo de realización, el término aproximadamente indica un intervalo de un +/- 10 % del siguiente valor numérico posterior. En un modo de realización, el término aproximadamente indica un intervalo de un +/- 5 % del siguiente valor numérico posterior.
- 10 El término "alteración" indica la sustitución, adición o delección de uno o más residuos aminoacídicos en un anticuerpo o polipéptido de fusión original que comprende al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para obtener un anticuerpo o polipéptido de fusión modificado.
- 15 El término "sustitución aminoacídica" indica el reemplazo de al menos un residuo aminoacídico existente por otro residuo aminoacídico diferente (residuo aminoacídico de reemplazo). El residuo aminoacídico de reemplazo puede ser un "residuo aminoacídico natural" y seleccionarse del grupo que consiste en alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).
- 20 El término "inserción aminoacídica" indica la incorporación de al menos un residuo aminoacídico en una posición predeterminada en una secuencia aminoacídica. En un modo de realización, la inserción será la inserción de uno o dos residuos aminoacídicos. El/los residuo(s) aminoacídico(s) insertado(s) puede(n) ser cualquier residuo aminoacídico natural o no natural.
- 25 El término "delección aminoacídica" indica la eliminación de al menos un residuo aminoacídico en una posición predeterminada en una secuencia aminoacídica.
- 30 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten una propiedad de unión al FcRn.
- 35 El término "sustancia tampón" indica una sustancia que cuando está en solución puede estabilizar los cambios del valor de pH de la solución, por ejemplo, debido a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas.
- 40 El término "dominio CH2" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 231 a la posición EU 340 (sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, un dominio CH2 tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1:
 APELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVWDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQ E STYRWSVLT
 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAK.
- 45 El término "dominio CH3" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 341 a la posición EU 446. En un modo de realización, el dominio CH3 tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2: GQPREPO VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
 ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG.
- 50 El término "clase" de un anticuerpo indica el tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.
- 55 El término "región Fc de origen humano" indica la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina de origen humano que contiene al menos una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. En un modo de realización, la región Fc tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 10. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH publicación 91-3242.
- 60 El término "FcRn" indica el receptor Fc neonatal humano. FcRn funciona rescatando a la IgG de la vía de degradación lisosómica, dando como resultado un aclaramiento reducido y una semivida larga. El FcRn es una proteína heterodimérica que consiste en dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I de 50 kDa (α-FcRn) y una microglobulina β₂ (β2m) de 15 kDa. El FcRn se une con afinidad alta a la porción CH2-CH3 del dominio Fc
- 65

de la IgG. La interacción entre IgG y FcRn depende estrictamente del pH y se produce en una estequiometría 1:2, uniéndose una IgG a dos moléculas de FcRn por medio de sus dos cadenas pesadas (Huber, A.H., *et al.*, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083). La unión al FcRn se produce en el endosoma a pH ácido (pH <6,5) y se libera IgG en la superficie celular neutra (pH de aproximadamente 7,4). La naturaleza sensible al pH de la interacción facilita la protección mediada por FcRn de las IgG pinocitadas en las células a partir de la degradación intracelular mediante la unión al receptor en el entorno ácido de los endosomas. Entonces, el FcRn facilita el reciclado de la IgG a la superficie celular y su posterior liberación en la circulación sanguínea tras la exposición del complejo FcRn-IgG al entorno de pH neutro fuera de la célula.

El término "porción de unión al FcRn de una región Fc" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 243 a la posición EU 261 y aproximadamente desde la posición EU 275 a la posición EU 293 y aproximadamente desde la posición EU 302 a la posición EU 319 y aproximadamente desde la posición EU 336 a la posición EU 348 y aproximadamente desde la posición EU 367 a la posición EU 393 y la posición EU 408 y aproximadamente desde la posición EU 424 a la posición EU 440. En un modo de realización, se alteran uno o más de los siguientes residuos aminoacídicos de acuerdo con la numeración F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 y S440 (numeración EU).

El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

El término "región bisagra" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que une el dominio CH1 y el dominio CH2, por ejemplo, desde aproximadamente la posición 216 a aproximadamente la posición 230 de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat. La región bisagra es normalmente una molécula dimerica que consiste en dos polipéptidos con una secuencia aminoacídica idéntica. La región bisagra comprende, en general, aproximadamente 25 residuos aminoacídicos y es flexible, lo que permite que las regiones de unión a antígeno se muevan independientemente. La región bisagra se puede subdividir en tres dominios: el dominio bisagra superior, medio e inferior (Roux, *et al.*, J. Immunol. 161 (1998) 4083).

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoacídicos de regiones hipervariables (HVR) no humanas y residuos aminoacídicos de regiones estructurales (FR) humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos aminoacídicos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos aminoacídicos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos en regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3 (véase Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13

(2008) 1619-1633). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

5 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones, hámster y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

10 El término "anticuerpo monoclonal" indica un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en pequeñas cantidades. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una
15 preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por varias técnicas incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridomas, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de la inmunoglobulina humana; estando descritos dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

20 "Anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la
30 cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia aminoacídica de su dominio constante.

35 El término "residuo aminoacídico no natural" indica un residuo aminoacídico, distinto de los residuos aminoacídicos naturales enumerados anteriormente, que se puede unir covalentemente a los residuos aminoacídicos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los ejemplos de residuos aminoacídicos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina. Se enumeran otros ejemplos en Ellman, *et al.*, Meth. Enzym. 202 (1991) 301-336. Se informa de un procedimiento ejemplar para la síntesis de residuos aminoacídicos no naturales, por ejemplo, en Noren, *et al.*, Science 244 (1989) 182 y Ellman *et al.*, *supra*.

40 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia aminoacídica" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos de secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora
45 como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica de diversas maneras que se encuentran en la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos en el presente documento, sin embargo, los valores de % de
50 identidad de secuencia aminoacídica se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington DC, 20559, en la que se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir
55 del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

60 En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias aminoacídicas, el % de identidad de secuencia aminoacídica de una secuencia aminoacídica dada A con respecto a, con o frente a una secuencia aminoacídica dada B (que, de manera alternativa, se puede parafrasear como una secuencia aminoacídica dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia aminoacídica con respecto a, con o frente a una secuencia aminoacídica dada B) se calcula como sigue:

65 100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia aminoacídica A no es igual a la longitud de la secuencia aminoacídica B, el % de identidad de secuencia aminoacídica de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia aminoacídica de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia aminoacídica usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administrará la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "gradiente de pH lineal positivo" indica un gradiente de pH que se inicia en un valor de pH bajo (es decir, más ácido) y finaliza en un valor de pH más alto (es decir, menos ácido, neutro o alcalino). En un modo de realización, el gradiente de pH lineal positivo se inicia en un valor de pH de aproximadamente 5,5 y finaliza en un valor de pH de aproximadamente 8,8.

El término "gradiente de pH lineal negativo" indica un gradiente de pH que se inicia en un valor de pH alto (es decir, neutro o alcalino) y finaliza en un valor de pH más bajo (es decir, neutro o ácido). El gradiente de pH lineal negativo se puede iniciar en un valor de pH de aproximadamente 7,4 y finalizar en un valor de pH de aproximadamente 6,0.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión o mejora del pronóstico.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (véase, por ejemplo, Portolano, S., *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

Los términos "variante", "anticuerpo modificado" y "polipéptido de fusión modificado" indican moléculas que tienen una secuencia aminoacídica que difiere de la secuencia aminoacídica de una molécula original. Típicamente, dichas moléculas tienen una o más alteraciones, inserciones o deleciones. En un modo de realización, el anticuerpo modificado o el polipéptido de fusión modificado comprende una secuencia aminoacídica que comprende al menos una porción de una región Fc que no es natural. Dichas moléculas tienen menos de un 100 % de identidad de secuencia con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original. En un modo de realización, el anticuerpo variante o el polipéptido de fusión variante tiene una secuencia aminoacídica que tiene desde aproximadamente un 75 % a menos de un 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con la secuencia aminoacídica del anticuerpo original o polipéptido de fusión original, especialmente desde aproximadamente un 80 % a menos de un 100 %, especialmente desde aproximadamente un 85 % a menos de un 100 %, especialmente desde aproximadamente un 90 % a menos de un 100 % y especialmente desde aproximadamente un 95 % a menos de un 100 %. En un modo de realización, el anticuerpo original o el polipéptido de fusión original y el anticuerpo variante o el polipéptido de fusión variante difieren en uno (un único), dos o tres residuos aminoacídicos.

II. Composiciones y procedimientos

El receptor Fc neonatal (FcRn) humano desempeña un importante papel en el catabolismo de la IgG. Las propiedades/características de la unión al FcRn *in vitro* de las IgG son indicativas de sus propiedades farmacocinéticas *in vivo*. Dichos procedimientos *in vitro* serían de gran valor durante el desarrollo de anticuerpos, ya que se pueden evitar estudios *in vivo* repetidos (experimentos con animales, tiempo y costes reducidos). Hasta ahora, dichos análisis se han realizado, en general, usando ensayos de resonancia de plasmón superficial (RPS) (Wang, W., *et al.*, Drug Metab. Disp. 39 (2011) 1469-1477; Datta-Mannan, A., *et al.*, Drug Metab. Disp. 40 (2012) 1545-1555; Vaughn, D.E. y Bjorkman, P.J., Biochemistry 36 (1997) 9374-9380; Raghavan, M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 11200-11204; Martin, W.L.

y Bjorkman, P.J., *Biochemistry* 38 (1999) 12639-12647). También se han descrito procedimientos de fraccionamiento en flujo por campo de flujo asimétrico y calorimétrico para evaluar la afinidad de unión de IgG al FcRn (Huber, A.H., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 230 (1993) 1077-1083; Pollastrini, J., *et al.*, *Anal. Biochem.* 414 (2011) 88-98). Además de ser ensayos complejos, varios estudios que investigaron la correlación entre los parámetros de unión al FcRn *in vitro* determinados mediante RPS y la semivida en suero de anticuerpos *in vivo* no demostraron hasta el momento dicha correlación a pesar de las condiciones de reacción de unión mejoradas y el modelado apropiado (Gurbaxani, B., *et al.*, *Mol. Immunol.* 43 (2006) 1462-1473; Gurbaxani, B.M. y Morrison, S.L., *Mol. Immunol.* 43 (2006) 1379-1389; Gurbaxani, B., *Clin. Immunol.* 122 (2007) 121-124). La genomanipulación de la región Fc de la IgG1 para mejorar la afinidad de la IgG1 por FcRn a pH 6 y a pH neutro como se mide mediante la tecnología de RPS no dio como resultado una farmacocinética mejorada en macacos cangrejeros (Yeung, Y.A., *et al.*, *J. Immunol.* 182 (2009) 7663-7671). Sin embargo, solo modestos incrementos en la afinidad por FcRn a pH 6 en la variante de IgG1 N434A sin unión significativa simultánea al FcRn a pH 7,4 dieron como resultado una farmacocinética mejorada en primates, lo que demostró la importancia de la liberación por FcRn a pH 7,4 (véase Yeung, Y.A., anteriormente).

Una combinación de procedimientos conocidos podría lograr resultados analíticos comparables a los de la cromatografía de afinidad por FcRn, pero a expensas de una complejidad y esfuerzos incrementados.

Los procedimientos estándar actuales no reflejan apropiadamente la dependencia del pH fisiológico de las características de unión al FcRn que requieren un pH ácido para la unión endosómica, sino un pH neutro para la liberación de IgG en la superficie celular. El medio de pH influye en las propiedades de asociación propia de la molécula de FcRn. Los procedimientos actuales funcionan en condiciones estándar a un pH dado y, por tanto, detectan únicamente una instantánea de la compleja interacción FcRn-IgG, lo que previene una evaluación cinética consistente de la interacción IgG-FcRn. Esto también puede ser una de las razones de la carencia de correlación de la afinidad por FcRn entre el análisis de FcRn *in vitro* y la farmacocinética *in vivo* descubierta en varios estudios (véase anteriormente).

El análisis por RPS de la interacción IgG-FcRn proporciona un resultado cualitativo que indica las propiedades de unión esperada o anómala de una muestra, pero no da ninguna pista sobre la causa de la unión anómala ni tampoco una estimación cuantitativa de la cantidad de anticuerpo con unión anómala. La espectrometría de masas también da únicamente información cualitativa de una integridad alterada de la molécula de IgG. Por el contrario, la cromatografía de afinidad por FcRn permite analizar la muestra en condiciones fisiológicas apropiadas con una estequiometría 2:1 predominante en una mezcla de estequiometrías, que incluye las estequiometrías 1:2, 1:1 y 2:2, y un gradiente de pH que se puede ajustar para adaptar de manera precisa la separación de los diferentes picos encontrados en una muestra. Los diferentes picos se pueden cuantificar mediante su área bajo la curva respectiva y el eluido correspondiente a cada pico es susceptible de someterse a un análisis secundario, por ejemplo, para realizar determinaciones de la funcionalidad, análisis por recromatografía o espectrometría de masas.

Adicionalmente, a fin de proporcionar pautas posológicas terapéuticas para tratar la diversidad de enfermedades conocidas hoy en día y también las que se revelarán en el futuro, existe la necesidad de obtener anticuerpos adaptados a medida, así como polipéptidos que contengan la parte Fc.

Para adaptar a medida las características de unión al FcRn de un anticuerpo o un polipéptido de fusión que contiene la parte Fc, se modifican los residuos implicados en las funciones efectoras mediadas por la parte Fc y se han de someter a prueba los anticuerpos y polipéptidos de fusión modificados resultantes. Si no se cumplen las características requeridas, se realiza de nuevo el mismo procedimiento.

En un modo de realización, la parte Fc es la fracción de una región Fc que media en la unión al FcRn.

Por tanto, sería ventajoso proporcionar un procedimiento que pronosticara los cambios en las propiedades características de un anticuerpo modificado basándose en un procedimiento cromatográfico simple y que no requiera estudios *in vivo* para analizar los cambios de las características en el anticuerpo modificado.

En algunos casos, se desean anticuerpos con una semivida prolongada. Por ejemplo, los fármacos con una semivida prolongada en la circulación de un paciente que necesita un tratamiento requieren intervalos de dosificación disminuida o incrementada. Dichos anticuerpos también tienen la ventaja de una exposición incrementada a un sitio de enfermedad, por ejemplo, un tumor.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando en cromatografía de afinidad.

Se ha descubierto que una columna de cromatografía de afinidad que comprende un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando en cromatografía de afinidad tiene una estabilidad no esperada. Se puede usar durante al menos más de 100 ciclos de cromatografía y hasta aproximadamente 200 ciclos de cromatografía (equilibrado - separación - regeneración) sin una pérdida de rendimiento (selectividad y/o capacidad de unión).

Una columna de cromatografía de afinidad ejemplar comprende una matriz y grupos funcionales cromatográficos unidos a la matriz, caracterizada por que el grupo funcional cromatográfico unido a la matriz comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2.

- 5 Un uso ejemplar de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando es para la determinación de la semivida *in vivo* de un anticuerpo determinando la proporción de los tiempos de retención del anticuerpo y un anticuerpo de referencia. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.
- 10 Un procedimiento ejemplar para determinar la semivida *in vivo* de un anticuerpo en relación con un anticuerpo de referencia es determinando la proporción de los tiempos de retención determinados en una columna de afinidad con FcRn del anticuerpo y el anticuerpo de referencia.
- 15 Un aspecto de la invención es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para la separación de anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una parte Fc.
- 20 En el presente documento también se informa de un procedimiento para separar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una parte Fc.
- 25 En un modo de realización, la separación se selecciona de purificación, producción y análisis.
- Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para la separación de anticuerpos de la subclase IgG1 de los anticuerpos de la subclase IgG3.
- 30 Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para determinar la oxidación de metionina de un anticuerpo.
- 35 Un procedimiento ejemplar es un procedimiento para determinar el impacto sobre los residuos de metionina oxidados en la unión al FcRn en la parte Fc de un anticuerpo usando un procedimiento de cromatografía de afinidad como se informa en el presente documento.
- Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para determinar el nivel de oligomerización de un anticuerpo.
- 40 Un procedimiento ejemplar es un procedimiento para determinar el nivel de oligomerización de un anticuerpo usando un procedimiento de cromatografía de afinidad como se informa en el presente documento.
- 45 En general, el punto inicial para el procedimiento como se informa en el presente documento es un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que se caracteriza por su unión al FcRn.
- Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para cribar una colección de anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados de un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para los anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original.
- 50 Un procedimiento ejemplar es un procedimiento para cribar una colección de anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados de un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para los anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:
- 55 (a) aplicar los miembros individuales de la colección y el anticuerpo original o polipéptido de fusión original a una columna de cromatografía de afinidad por FcRn como se informa en el presente documento;
- 60 (b) recuperar los miembros individuales de la colección con un gradiente de pH y determinar los tiempos de retención individuales; y
- (c) seleccionar los anticuerpos o polipéptidos de fusión que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original.
- 65 En el presente documento se informa de un procedimiento para purificar un anticuerpo o un polipéptido de fusión, que comprende al menos una parte de unión al FcRn de una región Fc, de una mezcla de polipéptidos, comprendiendo el procedimiento aplicar la mezcla a una columna de afinidad con FcRn como se informa en el presente documento y eluir los

anticuerpos o el polipéptido de fusión, que comprende al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc, con un gradiente de pH y purificar así el anticuerpo o el polipéptido de fusión. En un modo de realización, la parte FcRn de una región Fc es de una región Fc humana, o una región Fc de ratón, o una región Fc de macaco cangrejero, o una región Fc de conejo, o una región Fc de hámster.

5

Los términos “un” y “una” indican uno o dos o tres o cuatro o cinco o seis y hasta 10⁹.

En un modo de realización, se aplica la mezcla de reacción/producción o el sobrenadante de cultivo bruto o parcialmente purificado a la columna de afinidad con FcRn a un primer valor de pH y el anticuerpo o el polipéptido de fusión se recupera de la columna de afinidad con FcRn a un segundo valor de pH.

10

En un modo de realización, el primer valor de pH es de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6. En un modo de realización, el primer valor de pH es de aproximadamente pH 5 o de aproximadamente pH 5,5 o de aproximadamente pH 6.

15

En un modo de realización, el primer valor de pH se selecciona de aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 3,6, aproximadamente pH 3,7, aproximadamente pH 3,8, aproximadamente pH 3,9, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,1, aproximadamente pH 4,2, aproximadamente pH 4,3, aproximadamente pH 4,4, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 4,6, aproximadamente pH 4,7, aproximadamente pH 4,8, aproximadamente pH 4,9, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,1, aproximadamente pH 5,2, aproximadamente pH 5,3, aproximadamente pH 5,4, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,6, aproximadamente pH 5,7, aproximadamente pH 5,8, aproximadamente pH 5,9, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,1, aproximadamente pH 6,2, aproximadamente pH 6,3 y aproximadamente pH 6,4.

20

En un modo de realización, el segundo valor de pH es de aproximadamente pH 8 a aproximadamente pH 9,5. En un modo de realización, el segundo valor de pH es de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 9. En un modo de realización, el segundo valor de pH es de aproximadamente pH 8,8.

25

En un modo de realización, el segundo valor de pH se selecciona desde aproximadamente pH 8,0, de aproximadamente pH 8,1, de aproximadamente pH 8,2, de aproximadamente pH 8,3, de aproximadamente pH 8,4, de aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 8,6, de aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 8,8, de aproximadamente pH 8,9, de aproximadamente pH 9,0, de aproximadamente pH 9,1, de aproximadamente pH 9,2, de aproximadamente pH 9,3, de aproximadamente pH 9,4 y de aproximadamente pH 9,5.

30

En un modo de realización, cada uno de los primeros valores de pH dados de aproximadamente pH 3,5, de aproximadamente pH 3,6, de aproximadamente pH 3,7, de aproximadamente pH 3,8, de aproximadamente pH 3,9, de aproximadamente pH 4,0, de aproximadamente pH 4,1, de aproximadamente pH 4,2, de aproximadamente pH 4,3, de aproximadamente pH 4,4, de aproximadamente pH 4,5, de aproximadamente pH 4,6, de aproximadamente pH 4,7, de aproximadamente pH 4,8, de aproximadamente pH 4,9, de aproximadamente pH 5,0, de aproximadamente pH 5,1, de aproximadamente pH 5,2, de aproximadamente pH 5,3, de aproximadamente pH 5,4, de aproximadamente pH 5,5, de aproximadamente pH 5,6, de aproximadamente pH 5,7, de aproximadamente pH 5,8, de aproximadamente pH 5,9, de aproximadamente pH 6,0, de aproximadamente pH 6,1, de aproximadamente pH 6,2, de aproximadamente pH 6,3 y de aproximadamente pH 6,4 se combina con cada uno de los segundos valores de pH dados de aproximadamente pH 8,0, de aproximadamente pH 8,1, de aproximadamente pH 8,2, de aproximadamente pH 8,3, de aproximadamente pH 8,4, de aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 8,6, de aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 8,8, de aproximadamente pH 8,9, de aproximadamente pH 9,0, de aproximadamente pH 9,1, de aproximadamente pH 9,2, de aproximadamente pH 9,3, de aproximadamente pH 9,4 y de aproximadamente pH 9,5.

35

40

45

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc (por ejemplo, un dominio constante de una inmunoglobulina tal como IgG1) que presentan una unión alterada al receptor Fc neonatal (FcRn).

50

Un procedimiento ejemplar es un procedimiento para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc (por ejemplo, un dominio constante de una inmunoglobulina tal como IgG1) que presentan una unión alterada al receptor Fc neonatal (FcRn).

55

Dichos anticuerpos o polipéptidos de fusión modificados muestran una unión incrementada o bien disminuida al FcRn en comparación con un anticuerpo o polipéptido de fusión original o en comparación con un anticuerpo de referencia o proteína de fusión de referencia y, por tanto, tienen una semivida en suero incrementada o disminuida, respectivamente.

60

Se pronostica que las variantes de la región Fc con afinidad incrementada por el FcRn (es decir, un tiempo de retención incrementado en una columna con FcRn, pero que todavía se eluyen antes de un valor de pH de pH 7,4, como se informa en el presente documento en comparación con un anticuerpo original o anticuerpo de referencia) tienen semividas en suero más largas en comparación con aquellas con una afinidad disminuida por el FcRn. Las variantes de la región Fc con afinidad incrementada por el FcRn tienen aplicaciones en procedimientos de tratamiento de mamíferos, especialmente

65

seres humanos, donde se desea una semivida larga del anticuerpo o polipéptido de fusión administrado, tal como en el tratamiento de una enfermedad o trastorno crónico. Las variantes de la región Fc con afinidad disminuida por el FcRn tienen aplicaciones en procedimientos de tratamiento de mamíferos, especialmente seres humanos, donde se desea una semivida corta del anticuerpo o polipéptido de fusión administrado, tal como en el diagnóstico por la imagen *in vivo*.

5

Es muy probable que las variantes de la región Fc con afinidad de unión al FcRn disminuida puedan atravesar la placenta y, por tanto, se puedan usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas, especialmente de los fetos. Además, se puede desear una afinidad de unión al FcRn reducida para aquellos fármacos destinados a su aplicación/transporte al cerebro, riñón y/o hígado.

10

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que presentan un transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde el sistema vascular.

15

El anticuerpo o polipéptido de fusión que comprende una región Fc modificada como se informa en el presente documento puede presentar un transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde el sistema vascular.

20

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que presentan un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica desde el cerebro al espacio vascular.

25

El anticuerpo o polipéptido de fusión que comprende una región Fc modificada de origen humano como se informa en el presente documento puede presentar un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BHE) desde el cerebro al espacio vascular.

En el presente documento se informa de procedimientos de preparación de dichos anticuerpos y polipéptidos de fusión modificados que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc.

30

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, es la al menos una parte de una región Fc, al menos una parte de una región Fc de origen humano. En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el FcRn se selecciona de FcRn humano, FcRn de macaco cangrejero, FcRn de ratón, FcRn de rata, FcRn de oveja, FcRn de perro y FcRn de conejo.

35

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, la microglobulina beta 2 es de la misma especie que el FcRn.

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, la microglobulina beta 2 es de una especie diferente que el FcRn.

40

En un modo de realización, las regiones Fc o las partes de unión al FcRn de una región Fc derivan de cadenas pesadas de cualquier isotipo.

45

En un modo de realización, la al menos una parte de una región Fc comprende al menos los residuos aminoacídicos 282-340 de un dominio CH2 de origen humano (SEQ ID NO: 01, numeración de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, la al menos una porción de una región Fc comprende un dominio CH2 completo (aproximadamente los residuos aminoacídicos 231-340 de una región Fc de polipéptido de cadena pesada de anticuerpo de origen humano de acuerdo con la numeración EU de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, la al menos una porción de una región Fc comprende al menos un dominio CH2 y al menos una de una región bisagra (aproximadamente los residuos aminoacídicos 216-230 de una región Fc de polipéptido de cadena pesada de anticuerpo de origen humano de acuerdo con la numeración EU) o un dominio CH3 (aproximadamente los residuos aminoacídicos 341-446 de una región Fc de polipéptido de cadena pesada de anticuerpo de origen humano de acuerdo con la numeración EU). En un modo de realización, la al menos una porción de una región Fc comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de una cadena pesada de anticuerpo de origen humano. En un modo de realización, la al menos una porción de una región Fc comprende una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de una región Fc de cadena pesada de anticuerpo de origen humano. Las regiones Fc de origen humano o partes de unión al FcRn de una región Fc de porciones de origen humano pueden derivar de cadenas pesadas de cualquier isotipo, tal como IgG1 (SEQ ID NO: 03), IgG2 (SEQ ID NO: 04), IgG3 (SEQ ID NO: 05) e IgG4 (SEQ ID NO: 06). En un modo de realización, el isotipo humano es IgG1.

50

55

Se pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a una diana en mamíferos mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (por ejemplo, antígeno purificado, células o extractos celulares que comprenden dichos antígenos o ADN que codifica dicho antígeno) y opcionalmente un adyuvante.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

60

En un modo de realización de todos los aspectos previos, el pH es un gradiente desde aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,8.

65

En general, el dominio de unión se fusiona al extremo C o al extremo N de la al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc.

5 Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para seleccionar anticuerpos con una unión al FcRn a un valor de pH de pH 7,4 para la (co)selección *in vivo*. La (co)selección puede ser una internalización.

10 En general, el dominio extracelular soluble de FcRn (SEQ ID NO: 07 para el FcRn humano) con etiqueta His-Avi C terminal (SEQ ID NO: 08) se coexpresó con microglobulina β_2 (SEQ ID NO: 09 para la microglobulina beta 2 humana) en células de mamífero. El complejo de FcRn-microglobulina no covalente se biotiniló y cargó en Sepharose derivatizada con estreptavidina.

15 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 se une a una fase sólida.

20 Una "fase sólida" indica una sustancia no fluida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y microesferas) preparadas a partir de materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias en gel tales como sílice, alúmina y geles poliméricos; capilares, que se pueden preparar a partir de polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microvaloración; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros recipientes de muestra para espectrómetro. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue de las superficies sólidas inertes en que un "soporte sólido" contiene al menos un resto en su superficie, que está destinado a interactuar químicamente con una molécula. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un chip, tubo, tira, cubeta o placa de microvaloración, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como microesferas y micropartículas. También se pueden usar micropartículas como soporte sólido para formatos de ensayo homogéneos. Se pueden usar varias micropartículas que permitan la fijación tanto covalente como no covalente de proteínas y otras sustancias. Dichas partículas incluyen partículas poliméricas, tales como poliestireno y poli(metacrilato de metilo); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido de metal. Véase, por ejemplo, Martin, C.R., *et al*, Analytical Chemistry-News & Features, 1 de mayo (1998) 322A-327A. En un modo de realización, el soporte sólido es Sepharose.

35 La conjugación del complejo no covalente con la fase sólida se puede realizar uniendo químicamente, por medio de grupos N terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfhidrido, hidroxilo y/o fenólicos de la cadena principal aminoácídica del anticuerpo, y/o grupos aldíto de la estructura glucídica del anticuerpo.

40 El complejo no covalente se conjuga con la fase sólida por medio de un par de unión específica. El complejo no covalente se conjuga con biotina y se realiza la inmovilización en un soporte sólido por medio de avidina o estreptavidina inmovilizada en un soporte sólido.

45 Se puede seleccionar un par de unión específica (primer componente/segundo componente) de estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., *et al.*, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996)), lectina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroide, hormona/receptor hormonal, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc.

La recuperación del anticuerpo unido a la columna de afinidad con FcRn como se informa en el presente documento en los usos y procedimientos como se informa en el presente documento es mediante una elución con gradiente lineal. El gradiente lineal es un gradiente de pH.

50 En principio, se puede usar cualquier sustancia tampón en los procedimientos como se informa en el presente documento.

55 Se han identificado residuos de Fc críticos para la interacción Fc de ratón-FcRn de ratón mediante mutagénesis dirigida por sitio (véase, por ejemplo, Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180). Los residuos I253, H310, H433, N434 y H435 (numeración EU de acuerdo con Kabat) están implicados en la interacción (Medesan, C., *et al.*, Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533; Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993; Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542). Se descubrió que los residuos I253, H310 y H435 eran críticos para la interacción de Fc humana con FcRn murino (Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819). Los residuos M252Y, S254T, T256E se han descritos por Dall'Acqua *et al.* para mejorar la unión al FcRn mediante estudios de interacción proteína-proteína (Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524). Los estudios del complejo Fc humana-FcRn humano han demostrado que los residuos I253, S254, H435 e Y436 son cruciales para la interacción (Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). En Yeung, Y.A., *et al.* (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) se han informado de y examinado diversos mutantes de los residuos 248 a 259 y 301 a 317 y 376 a 382 y 424 a 437.

65 El tiempo de retención de diferentes anticuerpos obtenidos con diferentes tampones de elución se muestra en la siguiente tabla.

Tabla.

tampón de elución	tiempo de retención [min]				
	anticuerpo anti-Her2 (mutante I253H)	anticuerpo anti-Ox40L	anticuerpo anti-Abeta (natural)	anticuerpo anti-Abeta (mutante YTE)	
				pico 1	pico 2
Tris/HCl 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8	sin unión	45	45,5	52,5	66
Tris/HCl 20 mM, con NaCl 300 mM, ajustado a pH 8,8	no determinado	42,5	43	48,5	51,5
Tris/HCl 20 mM, con NaCl 50 mM, ajustado a pH 8,8	no determinado	43	44	51	-
HEPES 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,6	no determinado	48	48,5	63	76

El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

- 5 En un modo de realización, se usa una sustancia tampón farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfolina, ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico (MES) o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo, ácido (4-(2-hidroxi)etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) o sales del mismo.
- 10 En un modo de realización, la sustancia tampón se selecciona de ácido fosfórico o sales del mismo, o ácido acético o sales del mismo, o ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma.
- 15 En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de desde 10 mM a 500 mM. En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de desde 10 mM a 300 mM. En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de desde 10 mM a 250 mM. En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de desde 10 mM a 100 mM. En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de desde 15 mM a 50 mM. En un modo de realización, la sustancia tampón tiene una concentración de aproximadamente 20 mM.
- 20 En un modo de realización, la sustancia tampón en la primera solución y la sustancia tampón en la segunda solución son la misma sustancia tampón.
- 25 En un modo de realización, la sustancia tampón en la primera solución y la sustancia tampón en la segunda solución son diferentes sustancias tampón.
- 30 En un modo de realización, la primera solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 7,5. En un modo de realización, la primera solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6. En un modo de realización, la primera solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 5,5.
- 35 En un modo de realización, la segunda solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 9,5. En un modo de realización, la segunda solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 8 a aproximadamente pH 9. En un modo de realización, la segunda solución tiene un valor de pH de aproximadamente pH 8,2 a aproximadamente pH 8,8.
- 40 Una primera solución ejemplar comprende MES 20 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 5,5.
Una segunda solución ejemplar comprende TRIS 20 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8.
Una segunda solución ejemplar comprende HEPES 20 mM ajustado a pH 8,6.
- 45 Una segunda solución ejemplar comprende TRIS 20 mM ajustado a pH 8,2.
- En un modo de realización, la solución tamponada comprende una sal adicional. En un modo de realización, la sal adicional se selecciona de cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio. Un modo de realización comprende la solución tamponada de desde 50 mM a 1000 mM de la sal adicional. Un modo de realización comprende la solución tamponada de desde 50 mM a 750 mM de la sal adicional. Un modo de realización comprende la solución tamponada de desde 50 mM a 500 mM de la sal adicional. Un modo de realización comprende la solución tamponada de desde 50 mM a 750 mM de la sal adicional. Un modo de realización comprende la solución tamponada de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de la sal adicional.

En un modo de realización, la primera y/o segunda solución comprende cloruro de sodio. En un modo de realización, la primera y/o segunda solución comprende de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de cloruro de sodio.

5 Se ha descubierto que la clase de sal y sustancia tampón influyen en el tiempo de retención y la resolución. Se puede determinar una concentración de sal óptima para la unión de anticuerpos al FcRn (NaCl 150 mM). Si la concentración de sal es más alta (300 mM), se reduce la unión al FcRn/se obtiene un tiempo de retención más corto. Lo mismo es cierto para una concentración de sal más baja (50 mM). HEPES 20 mM pH 8,6 tiempo de retención prolongado para todos los anticuerpos sometidos a prueba.

10 Como se puede ver a partir de la figura 1, la cantidad de anticuerpo aplicado muestra una correlación lineal con el área bajo la curva del pico eluido.

15 Se analizaron ocho anticuerpos como anticuerpo completo y después escisión con la enzima IDES. La escisión se controló mediante SDS page y SEC analítica. La parte Fc y la parte Fab del anticuerpo se separaron mediante SEC preparativa. En la siguiente tabla se dan los tiempos de retención del anticuerpo completo, de la parte Fab y de la parte Fc.

Tabla.

anticuerpo	tiempo de retención [min]		
	anticuerpo completo	parte Fc	parte Fab
anticuerpo anti-Her2 (mutante I253H)	sin unión	no determinado	no determinado
anticuerpo anti-IGF-1R	44,5	45	sin unión
anticuerpo anti-IL13R α	44,5	45	sin unión
anticuerpo anti-Her2	45	45	sin unión
anticuerpo anti-IL 6R	45	45	sin unión
anticuerpo anti-Ox40L	45	45	sin unión
anticuerpo anti-Abeta (natural)	45	45	sin unión
anticuerpo anti-Abeta (mutante YTE)	pico 1: 52,5	52	sin unión
	pico 2: 66		

El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

20 En general, el tiempo de retención de los anticuerpos que tienen una parte Fc natural (IgG1 o IgG2 o IgG4) varía entre 45 y 49 min (sometido a prueba con 35 anticuerpos terapéuticos frente a 36 antígenos, datos no mostrados).

25 En la siguiente tabla se muestra el tiempo de retención con respecto a la cantidad de receptor FcRn inmovilizado por gramo de material de columna.

Tabla.

tampón de elución:	tiempo de retención [min]				
	anticuerpo anti-Her2 (mutante I253H)	anticuerpo anti-Ox40L	anticuerpo anti-Abeta (natural)	anticuerpo anti-Abeta (mutante YTE)	
				pico 1	pico 2
Tris/HCl 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8					
1,2 mg de FcRn/g de fase sólida	no determinado	42,5	42,5	48,5	54
3 mg de FcRn/g de fase sólida	sin unión	45	45,5	52,5	66
6 mg de FcRn/g de fase sólida	no determinado	48,5	49	53	74
12 mg de FcRn/g de fase sólida	no determinado	48,5	49	58	75

El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

30 El fragmento FAB del anticuerpo anti-Abeta comprende un sitio de glucosilación.

Por tanto, un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para detectar la modificación en FAB. En un modo de realización, la modificación es glucosilación o distribución de carga.

35 En general, el tiempo de retención en los procedimientos y usos como se informa en el presente documento depende de la pendiente del gradiente de pH y la concentración de sal empleada. El anticuerpo natural se usa como referencia y se

indica una unión más débil mediante un tiempo de retención más corto (= elución más temprana), mientras que se indica una unión más fuerte mediante un tiempo de retención más largo (= elución más tardía), pero todavía antes de un valor de pH de pH 7,4.

5 Se ha descubierto que diferentes mutantes de la parte Fc de la IgG se comportan de forma diferente en la columna con FcRn, presentando tiempos de retención modificados.

Por ejemplo, el mutante YTE del anticuerpo anti-Abeta muestra un tiempo de retención incrementado. El segundo pico del mutante YTE del anticuerpo anti-Abeta se debe a un sitio de glucosilación adicional introducido en la parte Fab.

10

Por ejemplo, el mutante YTE del anticuerpo anti-IGF-1R muestra un tiempo de retención incrementado (véase la figura 2).

Tabla.

anticuerpo	tiempo de retención [min]
anticuerpo anti-IGF-1R (natural)	44,5
anticuerpo anti-IGF-1R (mutante YTE)	57,5
anticuerpo anti-Abeta (natural)	45
anticuerpo anti-Abeta (mutante YTE)	pico 1: 52,5 pico 2: 66

El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

15

Se ha descubierto que con la columna con FcRn como se informa en el presente documento es posible identificar aminoácidos pertinentes en la unión al FcRn y clasificar los mutantes en comparación con el anticuerpo natural no modificado.

20

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para identificar aminoácidos pertinentes en la unión al FcRn y para clasificar los mutantes en comparación con el anticuerpo natural no modificado.

25

Los resultados obtenidos con un anticuerpo anti-Her2 se presentan en la siguiente tabla (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/031370 como referencia ejemplar).

Tabla.

mutación	tiempo de retención [min]	tiempo de retención [% del natural]
I253H	sin unión	-
M252D	sin unión	-
S254D	sin unión	-
R255D	41,4	89
M252H	43,6	94
K288E	45,2	98
L309H	45,5	98
E258H	45,6	99
T256H	46,0	99
K290H	46,2	100
D98E	46,2	100
natural	46,3	100
K317H	46,3	100
Q311H	46,3	100
E430H	46,4	100
T307H	47,0	102
N434H	52,0	112

Se ha descubierto que los anticuerpos que mostraban una elución tardía de la columna con FcRn, es decir, que tenían un tiempo de retención más largo en la columna con FcRn, tenían una semivida *in vivo* más larga. Los datos *in vivo* se muestran en la siguiente tabla.

5

Tabla.		
anticuerpo	tiempo de retención [min]	semivida <i>in vivo</i> [h]
anticuerpo anti-Abeta (natural)	45,5	103 +/- 51
anticuerpo anti-Abeta (mutación YTE)	52,5/66	197 +/- 53
anticuerpo anti-IGF-1R (natural)	45,5	97 +/- 9
anticuerpo anti-IGF-1R (mutante YTE)	58	211 +/- 41

El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para determinar la semivida *in vivo* de un anticuerpo.

10

El conjunto de experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados con IgG natural y variantes de IgG con mutaciones YTE en la parte Fc permitió demostrar una correlación semicuantitativa de los hallazgos en la cromatografía de afinidad por FcRn con los de los estudios farmacocinéticos *in vivo* con ratones transgénicos para FcRn humano (Spiekerman, G.M., *et al.* J. Exp. Med. 196 (2002) 303-310; Dall'Acqua, W.F., *et al.*, J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524). La mutación YTE da lugar a una semivida significativamente prolongada y a un aclaramiento plasmático más lento. La semivida *in vivo* más larga correspondió a un tiempo de retención más largo en la cromatografía con FcRn. Recientemente se demostró que una semivida prolongada de una variante de trastuzumab genomanipulada en Fc tenía una unión *in vitro* potenciada al FcRn como se mide mediante citometría de flujo (Petkova, S.B., *et al.*, Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769). Una variante del anticuerpo IgG1 anti-VEGF bevacizumab con una afinidad por FcRn mejorada 11 veces demostró que tenía una semivida prolongada cinco veces en ratones transgénicos para FcRn humano y una semivida tres veces mayor en macacos cangrejeros (Zalevsky, J., *et al.*, Nat. Biotechnol. 28 (2010) 157-159).

15

20

Se ha descubierto que se puede lograr el análisis y la eliminación de semianticuerpos en las preparaciones de IgG usando una columna con FcRn como se informa en el presente documento. En la figura 3 se muestra una cromatografía en columna con FcRn ejemplar.

25

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para la eliminación de semianticuerpos de las preparaciones de IgG.

30

Se ha descubierto que se pueden separar los oligómeros y agregados mediante cromatografía con FcRn como se informa en el presente documento (véase la figura 4).

35

Un uso ejemplar es el uso de un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando para la eliminación de agregados del anticuerpo y oligómeros del anticuerpo de las preparaciones de IgG.

Se ha descubierto que el tiempo de retención está influenciado por el número de partes Fc comprendidas en la molécula de analito. Esto se demostró usando construcciones que contenían una o dos partes Fc (véase la figura 5).

40

Se ha descubierto que la oxidación tenía un impacto en la unión al FcRn y se pudo demostrar en una columna con FcRn (véase la figura 6).

Se ha demostrado que el formato del anticuerpo no tuvo ningún impacto sobre la unión a la columna con FcRn. Esto se demostró para el formato botón en ojal y para varios formatos del anticuerpo biespecífico. Por tanto, se puede usar la columna con FcRn para la evaluación de nuevos formatos del anticuerpo.

45

El complejo está monobiotinilado.

En un modo de realización, el material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando tiene una estabilidad de al menos 100 ciclos en los procedimientos y usos como se informa en el presente documento. Un ciclo es un gradiente de pH desde el primer valor de pH hasta el segundo valor de pH del procedimiento o uso respectivo por lo que para la regeneración del material no se requiere ningún cambio adicional de las condiciones además de las condiciones finales del procedimiento o uso. Por tanto, en un modo de realización, un ciclo es un gradiente de pH desde aproximadamente un valor de pH de pH 5,5 a aproximadamente un valor de pH de pH 8,8.

55

Se ha descubierto que un intercambio aminoacídico de M por H en la posición 252 en combinación con un intercambio aminoacídico de M por E en la posición 428 da como resultado un tiempo de retención acortado (véase la figura 7).

60

La muestra de anticuerpos con los productos de oxidación en Met252 y Met428 ilustra la diferencia entre la técnica de RPS y la cromatografía de afinidad por FcRn. Mientras que el análisis por RPS de las muestras detectó una diferencia relativa en la unión de la muestra de aproximadamente un 20 % en comparación con el patrón de referencia, no proporcionó una explicación sobre la heterogeneidad de esta muestra. Por el contrario, la cromatografía de afinidad por FcRn de la misma muestra presentó dos picos distintos, uno en el tiempo de retención del patrón de referencia y el segundo pico significativamente desplazado a la izquierda, lo que indicaba una interacción más débil del anticuerpo en la muestra sometida a agresión con el material de la columna con FcRn a pH más bajo.

Un material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando como se informa en el presente documento se puede usar para el aislamiento/separación de fragmentos de anticuerpo y, por tanto, proporciona una alternativa a la cromatografía de afinidad con proteína A convencional. Además, usando el material de cromatografía como se informa en el presente documento, se puede efectuar la separación en condiciones más fisiológicas, tales como el valor de pH, en comparación con la cromatografía de afinidad con proteína A convencional.

El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar para la determinación/separación/enriquecimiento de especies de anticuerpos que comprenden modificaciones tales como, por ejemplo, oxidación, variantes de carga, glucosilación y desamidación. El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar dependiendo del gradiente de pH elegido (valor de pH inicial/final) para el enriquecimiento de determinadas especies de anticuerpos.

El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar para el aislamiento/enriquecimiento de especies de anticuerpos mediante variación/diferencia de peso molecular.

El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar para el aislamiento/enriquecimiento de anticuerpos por el número de sitios de unión al FcRn en la molécula.

El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar para el aislamiento de modificaciones aminoacídicas. El material de cromatografía que comprende un complejo no covalente del receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 como ligando se puede usar para el aislamiento/separación de emparejamientos erróneos de anticuerpos biespecíficos, tales como dímeros y semianticuerpos ojal-oyal.

Modos de realización ejemplares

1. Uso de un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) como ligando en cromatografía de afinidad en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal positivo.
2. El uso de acuerdo con el punto 1, caracterizado por que está en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal positivo para separar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una región Fc.
3. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 2, caracterizado por que el receptor Fc neonatal y la microglobulina beta 2 son independientemente entre sí de origen humano, o de origen de ratón, o de origen de macaco cangrejero, o de origen de rata, o de origen de conejo.
4. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizado por que la microglobulina beta 2 es de la misma especie que el receptor Fc neonatal.
5. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, caracterizado por que el receptor Fc neonatal y la microglobulina beta 2 son el receptor Fc neonatal natural humano y la microglobulina beta 2 natural humana, cada uno independientemente entre sí con de 0 a 10 modificaciones de residuos aminoacídicos.
6. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5, caracterizado por que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se une a una fase sólida.
7. El uso de acuerdo con el punto 6, caracterizado por que la fase sólida es un material de cromatografía.
8. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 6 a 7, caracterizado por que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se biotinila y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.

9. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 8, caracterizado por que el gradiente de pH es desde un primer valor de pH a un segundo valor de pH, por lo que el primer valor de pH es desde aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 7,5 y el segundo valor de pH es desde aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,5.
- 5 10. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 9, caracterizado por que el primer valor de pH es de aproximadamente pH 5,5 y el segundo valor de pH es de aproximadamente pH 8,8.
11. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para la determinación de la semivida *in vivo* de un anticuerpo determinando la proporción de los tiempos de retención del anticuerpo y un anticuerpo de referencia.
- 10 12. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para determinar la oxidación de metionina de un anticuerpo.
- 15 13. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para determinar el nivel de oligomerización de un anticuerpo.
14. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para cribar una colección de anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados de un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para los anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original.
- 20 15. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc que presentan una unión alterada al receptor Fc neonatal.
- 25 16. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para la eliminación de semianticuerpos de las preparaciones de IgG.
- 30 17. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, caracterizado por que el uso es para la eliminación de agregados del anticuerpo y oligómeros del anticuerpo de las preparaciones de IgG.
- 35 18. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 17, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo trispecífico del polipéptido de fusión o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tetraespecífico del polipéptido de fusión.
- 40 19. Uso de un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) como ligando en cromatografía de afinidad en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal negativo.
- 45 20. El uso de acuerdo con el punto 19, caracterizado por que está en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal negativo para separar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una región Fc.
21. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 20, caracterizado por que el receptor Fc neonatal y la microglobulina beta 2 son independientemente entre sí de origen humano, o de origen de ratón, o de origen de macaco cangrejero, o de origen de rata, o de origen de conejo.
- 50 22. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 21, caracterizado por que la microglobulina beta 2 es de la misma especie que el receptor Fc neonatal.
23. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 22, caracterizado por que el receptor Fc neonatal y la microglobulina beta 2 son el receptor Fc neonatal natural humano y la microglobulina beta 2 natural humana, cada uno independientemente entre sí con de 0 a 10 modificaciones de residuos aminoacídicos.
- 55 24. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 23, caracterizado por que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se une a una fase sólida.
- 60 25. El uso de acuerdo con el punto 24, caracterizado por que la fase sólida es un material de cromatografía.
26. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 24 a 25, caracterizado por que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se biotinila y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.
- 65

27. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 26, caracterizado por que el gradiente de pH es desde un primer valor de pH a un segundo valor de pH, por lo que el primer valor de pH es desde aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,5 y el segundo valor de pH es desde aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,9.
- 5 28. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 27, caracterizado por que el primer valor de pH es de aproximadamente pH 7,4 y el segundo valor de pH es de aproximadamente pH 6,0.
29. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para la determinación de la semivida *in vivo* de un anticuerpo determinando la proporción de los tiempos de retención del anticuerpo y un anticuerpo de referencia.
- 10 30. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para determinar la oxidación de metionina de un anticuerpo.
- 15 31. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para determinar el nivel de oligomerización de un anticuerpo.
32. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para cribar una colección de anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados de un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para los anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original.
- 20 33. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc que presentan una unión alterada al receptor Fc neonatal.
- 25 34. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para la eliminación de semianticuerpos de las preparaciones de IgG.
- 30 35. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 28, caracterizado por que el uso es para la eliminación de agregados del anticuerpo y oligómeros del anticuerpo de las preparaciones de IgG.
- 35 36. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 19 a 35, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo trispecífico del polipéptido de fusión o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tetraespecífico del polipéptido de fusión.
- 40 37. El uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, 18, 19 a 28 y 35, caracterizado por que el uso es para la separación de anticuerpos de la subclase IgG1 de los anticuerpos de la subclase IgG3.

1. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un polipéptido de fusión comprende un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para un análisis de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para un análisis de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; véase también el documento WO 93/16185; y los documentos US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada véase el documento US 5.869.046.

45 50

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 1993/01161; Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134).

55

Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

60

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas incluyendo, pero sin limitarse a, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

65

2. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenia en los seres humanos, mientras que se mantienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se analizan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua, W.F., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describe el "barajado de FR"); y Osbourn, J., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68 y Klimka, A., *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento del "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J., *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G., *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales humanas maduras (mutadas de manera somática) o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca, M., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

3. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 y Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459.

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan a los locus de inmunoglobulina endógena o que están presentes de manera extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para un análisis de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125. (Véanse también, por ejemplo, los documentos US 6.075.181 y US 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; el documento US 5.770.429, que describe la tecnología HuMab®; el documento US 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE®, y el documento US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos inalterados generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridomas. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromioma humano-de ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; y Boemer, P., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). También se describen anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li, J., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en el documento US 7.189.826 (que describe la

producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma) y Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 y Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191.

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias del dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. Entonces, dichas secuencias del dominio variable se pueden combinar con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

4. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar anticuerpos cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen varios procedimientos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R., *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37 y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty, J., *et al.*, *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T., *et al.*, *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. y Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Fee, C.V., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; y Fee, C.V., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132.

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, entonces, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter, G., *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455. Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de afinidad alta con respecto al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De manera alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths, A.D., *et al.*, *EMBO J.* 12 (1993) 725-734. Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom, H.R. y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388. Las publicaciones de patente que describen colecciones en fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: los documentos US 5.750.373, US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 y US 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

5. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, se pueden unir anticuerpos biespecíficos a dos epítomos diferentes del mismo antígeno. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan el antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, el documento WO 93/08829 y Traunecker, A., *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), y la genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos manipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.676.980, y Brennan, M., *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A., *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M., *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a diferentes antígenos (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

5 El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

10 **6. Variantes de anticuerpo**

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia aminoacídica de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias aminoacídicas del anticuerpo.

15 Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

20 Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se proporcionan cambios ejemplares en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares", y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales aminoacídicas. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno mantenida/mejorada,

25 inmunogenia disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

Tabla 1.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; He	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de cadena lateral:

30 (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

35

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

5 Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable (HVR) de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenia reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrán mantenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), y/o SDR (a-CDR), sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad mediante la construcción y reelección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R., *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. En algunos modos de realización de la maduración de afinidad, se introduce la diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de varios procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces, se crea una segunda colección. Entonces, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o las SDR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones aminoacídicas que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia aminoacídica incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glucosilación

La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia aminoacídica de tal manera que se crea o elimina uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el glúcido fijado al mismo se puede alterar. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija, en general, mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos glúcidos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido

biantenarío. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

5 Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser desde un 1 % a un 80 %, desde un 1 % a un 65 %, desde un 5 % a un 65 % o desde un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando el promedio de la cantidad de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras fijadas a Asn297 (por ejemplo, estructuras de manosa de alto contenido, híbridas y complejas) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los
10 residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "deficiente en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO
15 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A., *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas de células que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec 13 CHO deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka, J., *et al.*, Arch.
20 Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; el documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11), y líneas de células con genes inactivados, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con genes inactivados (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

25 Se pueden proporcionar adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío fijado a la región Fc del anticuerpo se biseca mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc.
30 Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

c) Variantes de la región Fc

35 En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo, generando así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas.

40 Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión al Fc γ R (por tanto es probable que carezca de actividad ADCC), pero mantiene su capacidad de unión a Fc γ Rn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en
45 la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en el documento US 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); el documento US 5,821,337 (véase Bruggemann, M., *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). De manera alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayo no radiactivo (véase, por ejemplo, el
50 ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De manera alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo
55 ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). También se pueden realizar la unión al Fc γ Rn y las determinaciones del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al.*,
60 Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de
65 Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con una unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

5 Una variante de anticuerpo puede comprender una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al.*, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K., *et al.*, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 252, 253, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

15 Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína

20 En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "THIOMAB", en los que se sustituyen uno o más residuos de un anticuerpo con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan así en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de fármaco-enlazador, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados modos de realización, uno cualquiera o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

35 Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización basándose en consideraciones, que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

III. Composiciones y procedimientos recombinantes

50 Se ha informado por primera vez de los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein (Nature 256 (1975) 495-497). Posteriormente, se ha informado de la producción de anticuerpos recombinantes con células de mieloma introduciendo de manera estable el ácido nucleico (ADN) que codifica el anticuerpo (véase Oi, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 6351-6355).

55 El ácido nucleico codificante de anticuerpos (para el anticuerpo completo o bien para los dominios variables) se puede aislar y secuenciar usando procedimientos convencionales a partir de una célula productora de anticuerpos. Después de su aislamiento, el ácido nucleico codificante se puede disponer en uno o más vectores de expresión. Si solo se aísla el ácido nucleico codificante del dominio variable, el vector de expresión también comprende un ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena pesada y/o de la cadena ligera, respectivamente (véase, por ejemplo, el documento US 5.658.570). El vector de expresión se puede transfectar en células huésped procariotas (*E. coli*) o eucariotas (CHO, HEK, BHK, SP2/0) que de otro modo no secretan anticuerpos.

65 Si el ácido nucleico codificante deriva de una colección de presentación, tal como una colección de presentación en fagos, una colección de presentación en levaduras, o, en general, una colección de presentación en superficies celulares, se puede clonar directamente en el vector de presentación.

Se pueden producir anticuerpos usando composiciones y procedimientos recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia aminoacídica que comprende el VL y/o una secuencia aminoacídica que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia aminoacídica que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia aminoacídica que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo como se informa en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y recuperar opcionalmente el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo como se informa en el presente documento, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento, por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni función efectora mediada por Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos y levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H., *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en conjunto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células de mamífero que estén adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero que pueden ser útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L., *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); las células de riñón de cría de hámster (BHK); las células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); las células de riñón de mono (CV1); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células humanas de carcinoma de cuello uterino (HELA); las células de riñón canino (MDCK); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); las células de pulmón humanas (W138); las células de hígado humano (Hep G2); el tumor de mama de ratón (MMT 060562); las células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; las células MRC 5; y las células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR⁻ CHO (Urlaub, G., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para un análisis de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

Se proporcionan los siguientes ejemplos, figuras y secuencias para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos**Procedimientos**

5

Ionización por electropulverización/espectrometría de masas/(ESI-EM)

Se desglucosilaron alícuotas de proteínas (50 µg) añadiendo 0,5 µl de N-Glycanase plus (Roche) y tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,1) para obtener un volumen de muestra final de 115 µl. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 18 h. Luego, para la reducción y desnaturalización se añadieron 60 µl de TCEP 0,5 M (Pierce) en guanidina * HCl 4 M (Pierce) y 50 µl de guanidina * HCl 8 M. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Se desalaron las muestras mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacrose G-25, isocrático, acetonitrilo al 40 % con ácido fórmico al 2 %). Se registraron espectros de masas de ESI (+ va) en un instrumento Q-TOF (maXis, Bruker) equipado con una fuente de nano-ESI (TriVersa NanoMate, Advion). Las configuraciones de los parámetros de EM fueron como sigue: transferencia: embudo de RF, 400 Vpp; energía ISCID, 0 eV; RF multipolar, 400 Vpp; cuadrupolo: energía iónica, 4,0 eV; masa baja, 600 m/z; fuente: gas seco, 8 l/min; temperatura del gas seco, 160 °C; celda de colisión: energía de colisión, 10 eV; RF de colisión: 2000 Vpp; refrigerador de iones: RF de refrigerador de iones, 300 Vpp; tiempo de transferencia: 120 µs; almacenamiento de prepulsos, 10 µs; intervalo de barrido de m/z de 600 a 2000. Para la evaluación de los datos se usó un programa informático desarrollado internamente (MassAnalyzer).

20

Análisis por resonancia de plasmón superficial (RPS) para FcRn

Se analizaron las propiedades de unión del anticuerpo natural y los mutantes al FcRn mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) usando un instrumento BIAcore T100 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Este sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones moleculares. Permite un seguimiento continuo en tiempo real de las uniones ligando/analito y, por tanto, la determinación de los parámetros cinéticos en diversas configuraciones de ensayo. La tecnología de RPS se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto con oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa en la superficie provocados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. Si las moléculas se unen a un ligando inmovilizado en la superficie, la masa se incrementa, en caso de una disociación, la masa disminuye. En el ensayo actual, se inmovilizó el receptor FcRn en un chip biosensor CM5 de BIAcore (GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Suecia) por medio de acoplamiento de amina a un nivel de 400 unidades de respuesta (UR). El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente con PBS, Tween 20 al 0,05 %, pH 6,0 (GE Healthcare Bioscience) como tampón de migración y dilución. Se inyectaron 200 nM de muestras de anticuerpos naturales u oxidados a un caudal de 50 µl/min a temperatura ambiente. El tiempo de asociación fue de 180 s, la fase de disociación llevó 360 s. La regeneración de la superficie del chip se alcanzó mediante una inyección corta de HBS-P, pH 8,0. Se realizó la evaluación de los datos de RPS mediante comparación de la altura de señal de respuesta biológica a los 180 s después de la inyección y a los 300 s después de la inyección. Los parámetros correspondientes son el nivel máx. de UR (180 s después de la inyección) y la estabilidad tardía (300 s después del final de la inyección).

40

Ejemplo 1**Preparación de la columna de afinidad con FcRn**Expresión de FcRn en células HEK293

Se expresó de manera transitoria el FcRn mediante transfección de células HEK293 con dos plásmidos que contenían la secuencia codificante de FcRn y de microglobulina beta 2. Se cultivaron las células transfectadas en matraces con agitador a 36,5 °C, 120 rpm (amplitud de agitador 5 cm), humedad al 80 % y CO₂ al 7 %. Se diluyeron las células cada 2-3 días hasta una densidad de 3 a 4*10⁵ células/ml.

50

Para la expresión transitoria, se inició en un biorreactor de acero inoxidable de 14 l con un volumen de cultivo de 8 l a 36,5 °C, pH 7,0 ± 0,2, pO₂ al 35 % (gasificando con N₂ y aire, flujo de gas total de 200 ml min⁻¹) y una velocidad de agitador de 100 - 400 rpm. Cuando la densidad celular alcanzó 20*10⁵ células/ml, se diluyeron 10 mg de ADN plasmídico (cantidades equimolares de ambos plásmidos) en 400 ml de Opti-MEM (Invitrogen). Se añadieron 20 ml de 293fectin (Invitrogen) a esta mezcla, que, entonces, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se transfirió posteriormente al fermentador. A partir del día siguiente en adelante, se suministraron nutrientes a las células en modo continuo: se añadió una solución de alimentación a una tasa de 500 ml por día y glucosa según fuera necesario para mantener el nivel por encima de 2 g/l. Se recogió el sobrenadante 7 días después de la transfección usando una centrifuga de cabezal oscilante con cubetas de 1 l: 4000 rpm durante 90 minutos. Se aclaró el sobrenadante (13 l) mediante un filtro Sartobran P (0,45 µm + 0,2 µm, Sartorius) y se purificó el complejo FcRn-microglobulina beta 2 a partir del mismo.

60

Biotinilación del receptor Fc neonatal

Se biotiniló un dominio extracelular soluble de FcRn con marca His-Avi que se había coexpresado con microglobulina β₂ en células HEK293 después de su purificación como sigue:

65

se biotinilaron entre 1,2 mg y 12 mg de FcRn/microglobulina β_2 en 5 ml de tampón citrato de sodio 20 mM, pH 5,5, que contenía KCl 150 mM, 250 μ l de PBS y 1 comprimido de inhibidor de proteasa Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) usando el kit de biotinilación de Avidity de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bulk BIRA). Se realizó la reacción de biotinilación a temperatura ambiente durante la noche. Se dializó la proteína modificada frente a tampón fosfato de sodio 20 mM que comprendía NaCl 150 mM, pH 7,5, a 4 °C durante la noche para eliminar el exceso de biotina.

Acoplamiento a Streptavidin Sepharose

Se añadió un gramo de Streptavidin Sepharose (GE Healthcare) al receptor biotinilado y dializado (entre 1,2 y 12 mg de FcRn/microglobulina β_2 , para la aplicación analítica estándar se eligieron 3 mg) y se incubó durante dos horas con agitación. Se cargó la Sepharose derivatizada con el receptor en una columna XK de 1 ml (GE Healthcare).

Ejemplo 2

Cromatografía usando la columna de afinidad con FcRn

Se cargó la Sepharose derivatizada con el receptor en una columna XK de 1 ml (GE Healthcare) y después se equilibró la columna con FcRn con tampón ácido 2-(N-morfolin)-etanosulfónico (MES) 20 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 5,5.

Condiciones:

dimensiones de la columna: 50 mm x 5 mm

altura de lecho: 5 cm

carga: 50 μ g de muestra

tampón de equilibrado: MES 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 5,5

tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8

elución: 7,5 VC de tampón de equilibrado, en 30 VC con respecto al tampón de elución al 100 %, 10 VC de tampón de elución

Se ajustaron las muestras de anticuerpos o proteínas de fusión que contenían de 50 a 100 μ g de proteína a pH 5,5 y se aplicaron a la columna con FcRn usando ÄKTA explorer 10 XT o Dionex Summit (Dionex, Idstein, Alemania). Entonces, se lavó la columna con una altura de lecho de 5 cm con 5-10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado MES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5. Se eluyeron las proteínas que contenían Fc unidas por afinidad con un gradiente de pH con Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,8, en 30 volúmenes de columna. Para la completa elución de anticuerpos modificados, se incrementó el pH en el gradiente hasta pH 8,8. Se llevaron a cabo los experimentos a temperatura ambiente. Se obtuvo el perfil de elución mediante medición continua de la absorbancia a 280 nm. El tiempo que tarda un pico de analito, X, en alcanzar el detector después de la inyección de la muestra se llamó el tiempo de retención.

Ejemplo 3

Correlación del tiempo de retención en la columna con FcRn con respecto a la semivida *in vivo*

Se midió la semivida *in vivo* en ratones C57BF/6J transgénicos para FcRn humano después de una única administración i.v. de 10 mg/k (n=8) y se comparó con el tiempo de retención en la columna con FcRn (véase la tabla). Se descubrió que los anticuerpos que mostraban una elución tardía de la columna con FcRn tenían una semivida más larga en ratones transgénicos para FcRn.

Tabla.

anticuerpo	tiempo de retención [min]	semivida <i>in vivo</i> [h]
anticuerpo anti-Abeta (natural)	45,5	103 +/- 51
anticuerpo anti-Abeta (mutación YTE)	52,5/66	197 +/- 53
anticuerpo anti-IGF-1R (natural)	45,5	97 +/- 9
anticuerpo anti-IGF-1R (mutante YTE)	58	211 +/- 41

Ejemplo 4

Purificación de FcRn humano, FcRn de ratón y FcRn de macaco cangrejero

Se cargaron los sobrenadantes aclarados que contenían proteínas marcadas con hexahis en una resina de cromatografía de afinidad Ni-NTA (Qiagen, Hanbrechtikon, Suiza) a 4 °C. Después de las etapas de lavado con tampón fosfato de sodio 20 mM que comprendía NaCl 500 mM a pH 7,4 y que contenía imidazol 20 mM, respectivamente 100 mM, se eluyeron las proteínas a un caudal de 2 ml/min usando la elución en lotes con el mismo tampón que contenía imidazol 300 mM en un sistema de cromatografía ÄKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se combinaron las fracciones y se purificaron adicionalmente en tampón fosfato de sodio que contenía NaCl 500 mM en cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex™ 200, GE Healthcare, Zúrich, Suiza). Se cuantificaron las proteínas purificadas usando un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) y se analizaron mediante SDS PAGE en geles NuPAGE 4-12 % Bis-Tris en tampón MES en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Ejemplo 5

Cromatografías en columna de afinidad con FcRn de ratón y macaco cangrejero

En la siguiente tabla se proporcionan los tiempos de retención de anticuerpos humanos ejemplares en columnas de afinidad que comprenden FcRn de macaco cangrejero. Se obtuvieron los datos usando las siguientes condiciones: tampón de elución: TRIS/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5. Descripción adicional: véase el ejemplo 2. El término mutante YTE indica el triple mutante M252Y/S254T/T256E.

anticuerpo	tiempo de retención [min]
anticuerpo anti-Abeta (natural)	48,8
anticuerpo anti-Abeta (mutante YTE)	57,4
anticuerpo anti-IGF-1R (natural)	51,2
anticuerpo anti-IGF-1R (mutante YTE)	63,0

En la siguiente tabla se proporcionan los tiempos de retención de anticuerpos humanos ejemplares en FcRn murino. Se obtuvieron los datos usando las siguientes condiciones: 1,2 mg de receptor acoplado a 1 ml de Sepharose. tampón de elución: TRIS/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5. Descripción adicional: véase el ejemplo 2. Los mutantes YTE no están incluidos en esta tabla, ya que no se podrían haber eluido a menos que el pH del tampón de elución se hubiera ajustado a 9,5.

anticuerpo	tiempo de retención [min]
anticuerpo anti-Abeta (natural)	54,7
anticuerpo anti-IGF-1R (natural)	48,8

La columna de afinidad con FcRn de macaco cangrejero se comporta de manera similar a la columna de afinidad con FcRn humano en relación con la unión de anticuerpos humanizados. Por otro lado, la unión de anticuerpos humanizados a la columna con FcRn murino es más fuerte que a la columna de afinidad con FcRn humano, como se puede observar mediante una retención más tardía.

Ejemplo 6

Generación de fragmentos de anticuerpo

Se separaron el fragmento F(ab')₂ y el fragmento de la región Fc mediante escisión del anticuerpo de longitud completa diluido 1:1 con Tris 100 mM, pH 8,0, añadiendo 1 µg de cisteína proteasa IdeS por 50 µg de anticuerpo e incubación durante 2 horas a 37 °C. Se separaron los productos de escisión resultantes, F(ab')₂ y Fc, en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Superdex 200, GE Healthcare, Zúrich, Suiza) usando un sistema de cromatografía ÄKTA Explorer (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se combinaron las fracciones de pico. Los patrones de peso molecular en la misma columna sirvieron para identificar los dos productos de escisión basándose en sus tiempos de retención.

Los tiempos de retención de anticuerpos de longitud completa variaron notablemente. Por el contrario, los tiempos de retención de las porciones de Fc respectivas de todos los anticuerpos sometidos a prueba no difieren prácticamente entre sí (<1 %).

Cuando se usó plasmina para la escisión de los anticuerpos de longitud completa, se obtuvieron los mismos hallazgos (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Correlación del tiempo de retención en la columna con FcRn con respecto al estado de oxidación

Se estudió la influencia de la oxidación del anticuerpo en el tiempo de retención en la cromatografía de afinidad por FcRn. Se observó la oxidación de un anticuerpo IgG1 (1 mg/ml) almacenando el anticuerpo a 40 °C durante 2 meses. Se analizaron las muestras de anticuerpos no modificados y oxidados mediante cromatografía de afinidad por FcRn y mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) para FcRn. Se caracterizó la oxidación del anticuerpo mediante identificación genética e ionización por electropulverización/espectrometría de masas (ESI-EM).

Los datos de ESI-EM revelaron que aproximadamente un 50 % de las cadenas pesadas del anticuerpo IgG1 se oxidaron en los residuos Met252 y Met428 expuestos al disolvente tras el almacenamiento en tampón (His/His*HCl 20 mM, trehalosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %) en condiciones aceleradas a 40 °C durante dos meses. Cuando se aplicaron las muestras sometidas a agresión a 40 °C que contenían anticuerpo oxidado y las muestras almacenadas a -80 °C y a 25 °C a una columna de afinidad en la que previamente se inmovilizó FcRn, se pudieron separar dos picos principales (figura 8). El segundo pico de la figura 8, que consistía en dos curvas prácticamente superpuestas con un tiempo de retención más largo, correspondía al tiempo de elución del anticuerpo no modificado en muestras almacenadas a 25 °C y a -80 °C, mientras que el pico de elución más temprana representaba el anticuerpo oxidado en Met252 y Met428. Se confirmó la presencia de Met252 y Met428 oxidadas mediante la variación de masa de 16 Da detectada en la muestra sometida a agresión mediante ESI-EM. El análisis de la muestra de anticuerpos sometida a agresión (40 °C) mediante RPS en BIAcore mostró el mismo patrón de respuesta en el sensograma que en la cromatografía con FcRn con dos especies de anticuerpos diferentes, es decir, el anticuerpo natural y el anticuerpo oxidado en Met252 y Met428 (figura 9).

Ejemplo 8

Correlación del tiempo de retención en la columna con FcRn con respecto a la formación de los agregados

Se evaluó la influencia de la formación de los agregados del anticuerpo en la interacción con FcRn en la cromatografía de afinidad para un anticuerpo anti-IL13Ralfa. Se aislaron las fracciones de monómeros y agregados del anticuerpo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y combinación de los picos respectivos. Se analizó la interacción con FcRn de las fracciones mediante cromatografía de afinidad y mediante tecnología de RPS.

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para aislar tres fracciones de anticuerpo anti-IL13Ralfa que contenían monómeros y agregados multiméricos del anticuerpo anti-IL13Ralfa para la cromatografía en columna con FcRn. Basándose en las áreas de pico del cromatograma, la muestra de anticuerpo anti-IL13Ralfa usada para la cromatografía de afinidad por FcRn contenía un 57 % de monómeros y un 43 % de agregados del anticuerpo anti-IL13Ralfa. El análisis de la muestra no fraccionada en la cromatografía de afinidad por FcRn reveló dos picos principales con diferentes tiempos de retención (figura 10). El pico más pequeño con un tiempo de retención más largo correspondía al de la fracción de agregados, mientras que la parte principal del pico de elución más rápida correspondía a la fracción de monómeros.

En el análisis por resonancia de plasmón superficial (RPS), se comparó un patrón de referencia de anticuerpo anti-IL13Ralfa con dos fracciones combinadas diferentes enriquecidas en agregados (combinación 1) y en monómeros (combinación 2) y con la combinación natural. La composición exacta del lote natural y de las fracciones combinadas se describe en la siguiente tabla.

TABLA: Composición de las fracciones combinadas naturales y enriquecidas de un anticuerpo anti-IL13Ralfa.

	monómeros [%]	dímeros de Fc [%]	agregados [%]
combinación inicial	91,0	8,6	0,4
combinación 1	27,7	26,9	45,4
combinación 2	98,3	1,4	0,4

El sensograma de la muestra de la combinación 2 enriquecida en monómeros fue el más cercano al del patrón de referencia, anticuerpo anti-IL13Ralfa, seguido del sensograma de la muestra escasa en agregados. Por el contrario, la combinación 1 enriquecida en agregados se caracterizó por una unión al FcRn de casi el doble en el análisis por RPS (figura 11).

Ejemplo 9

Estudio farmacocinético en ratones con FcRn humano

Se llevaron a cabo todos los procedimientos de acuerdo con las directrices de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (www.aalac.org). Se autorizó el estudio por el Consejo Regional de Alta Baviera, Alemania.

Se usaron ratones C57BL/6J macho y hembra (fondo); ratón deficitario en FcRn, pero hemiciótico transgénico para FcRn humano (huFcRn (276) -/tg (30, 31) durante el estudio farmacocinético.

En el momento de la administración, los animales pesaban entre 17 y 25 g. Se administró el anticuerpo respectivo como una única inyección intravenosa rápida por medio de la vena de la cola. Debido a la limitada volemia de los ratones, se requirió que tres grupos de cuatro animales macho y cuatro hembra cubrieran nueve puntos de tiempo de muestreo, es decir, tres puntos de tiempo de muestreo por animal. Se tomaron muestras de sangre en el grupo 1 a los 5 min, 24 horas y 336 horas, en el grupo 2 a las 2 horas, 168 horas y 504 horas y en el grupo 3 a las 8 horas, 48 horas y 672 horas después de la administración. Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 100 µl mediante punción

retrobulbar y se almacenaron a temperatura ambiente durante 60 min para permitir su coagulación. Se obtuvieron muestras de suero de al menos 40 µl mediante centrifugación a 9.300 x g a 4 °C durante 3 minutos y se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C hasta que se sometieron a ensayo.

- 5 Se determinaron las concentraciones séricas de los anticuerpos humanos terapéuticos en suero murino mediante un ensayo de inmunoadsorción (ELISA) de captura de antígenos específico para la región de unión a antígeno (Fab) del anticuerpo administrado y sus variantes. Se incubaron todos los reactivos o muestras a temperatura ambiente en un agitador a 400 rpm. Cada etapa de lavado incluyó tres ciclos. En resumen, se recubrieron placas de microvaloración recubiertas con estreptavidina con anticuerpo biotinilado diluido en tampón de ensayo. Después del lavado con solución salina tamponada con fosfato-polisorbato 20 (Tween 20), se añadieron muestras de suero en varias diluciones y se incubaron durante 1 h. Después del lavado, se detectaron anticuerpos terapéuticos humanos unidos mediante incubación posterior con fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales específicos para Fcγ humanos conjugados con digoxigenina que no reaccionan de manera cruzada con IgG de ratón. Después del lavado, se añadió un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 1 h. Después del lavado, se añadió ABTS (2,2'-azino-di[3-etilbenzotiazolinasulfonato, Roche Diagnostics, Alemania) como sustrato para HRP para formar un producto de reacción coloreado. Se leyó la absorbancia del producto de reacción resultante a 405 nm con una longitud de onda de referencia a 490 nm. Se analizaron por duplicado todas las muestras de suero y las muestras de control positivo o negativo y se calibraron frente al patrón de referencia.
- 10
- 15
- 20 Se calcularon los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimental, usando el programa de evaluación farmacocinética WinNonlin™ (Pharsight, St. Louis, MO, EE. UU.), versión 5.2.1. En resumen, se calculó el área bajo la curva de concentración/tiempo ABC (0-672) mediante una regla trapezoidal lineal (con interpolación lineal) desde tiempo 0 a infinito. La semivida terminal aparente ($T_{1/2}$) se derivó de la ecuación: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$. Se calculó el aclaramiento corporal total (AC) como dosis/ABC. Se determinaron las diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos entre el anticuerpo natural y sus variantes mediante análisis ANOVA.
- 25

El estudio farmacocinético en ratones C57BF/6J deficientes en FcRn de ratón, pero hemocigóticos transgénicos para FcRn humano (huFcRn (276) -/tg) mostró que la mutación YTE potenciaba la farmacocinética del anticuerpo (figura 12). A un nivel de significación estadística, el mutante YTE tenía una ABC (0-672) 1,74 veces más alta, un aclaramiento 1,95 veces más lento y una semivida terminal 2,2 veces más larga en comparación con el anticuerpo natural (tabla).

30

TABLA Parámetros farmacocinéticos para el anticuerpo natural y su triple mutante YTE obtenidos mediante análisis no compartimental de las concentraciones séricas medidas mediante ELISA después de una única inyección i.v. rápida de 10 mg/kg a ratones transgénicos para FcRn humano. Media ± DE, n=8 por grupo, análisis ANOVA de la significación en comparación con el anticuerpo natural (+++, p<0,001). ABC (0-672), área bajo la curva de concentración sérica-tiempo desde tiempo 0 a 672 h.

35

anticuerpo	ABC (0-672) [h*µg/ml]	Aclaramiento [ml/min/kg]	semivida terminal [h]
anticuerpo natural	15,693 ± 1,879	0,0107 ± 0,0013	96,8 ± 8,9
mutante YTE	27,359 ± 2,731	0,0055 ± 0,0006	211,4 ± 40,6

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Cromatografía de afinidad basada en el receptor Fc
 <130> 30801 WO

10 <150> EP12155630
 <151> 15-02-2012
 <160> 10

15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT

20 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105

25 <210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 2

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

ES 2 676 031 T3

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 100 105

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

10

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

ES 2 676 031 T3

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ES 2 676 031 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

ES 2 676 031 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325 330

5
 <210> 7
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 7

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
 20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
 35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
 85 90 95

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 115 120 125

15
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140

ES 2 676 031 T3

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220

Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
 245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
 260 265 270

Ser Ser

<210> 8
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> MARCA HIS—AVI

<400> 8

His His His His His His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 1 5 10 15

Ile Glu Trp His Glu
 20

15 <210> 9
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 9

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
 1 5 10 15

25

ES 2 676 031 T3

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
 20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
 35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
 50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
 65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
 85 90 95

Arg Asp Met

<210> 10
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región Fc

<400> 10

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

5

10

15

20

ES 2 676 031 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

REIVINDICACIONES

1. Uso de un complejo no covalente inmovilizado de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) como ligando en cromatografía de afinidad en una cromatografía de afinidad con un gradiente de pH lineal positivo para separar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una región Fc,
5 en el que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal y microglobulina beta 2 se une a un material de cromatografía y el complejo no covalente se conjuga con la fase sólida por medio de un par de unión específica,
10 en el que el gradiente de pH es desde un primer valor de pH a un segundo valor de pH, por lo que el primer valor de pH es desde pH 3,5 a pH 6,4 y el segundo valor de pH es desde pH 7,4 a pH 9,5, y
15 en el que el complejo no covalente de un receptor Fc neonatal (FcRn) y microglobulina beta 2 (b2m) se monobiotinila y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el receptor Fc neonatal y la microglobulina beta 2 son el receptor Fc neonatal natural humano y la microglobulina beta 2 natural humana, cada uno independientemente entre sí con de 0 a 10 modificaciones de residuos aminoacídicos.
- 20 3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que el primer valor de pH es de pH 5,5 y el segundo valor de pH es de pH 8,8.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para la determinación de la semivida *in vivo* de un anticuerpo determinando la proporción de los tiempos de retención del anticuerpo y un anticuerpo de referencia.
- 25 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para determinar la oxidación de metionina de un anticuerpo.
- 30 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para determinar el nivel de oligomerización de un anticuerpo.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para cribar una colección de anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados de un anticuerpo original o un polipéptido de fusión original que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc para los anticuerpos modificados o polipéptidos de fusión modificados que tienen una afinidad de unión alterada por FcRn en comparación con el anticuerpo original o polipéptido de fusión original.
- 35 8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para identificar anticuerpos o polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción de unión al FcRn de una región Fc que presentan una unión alterada al receptor Fc neonatal.
- 40 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para la eliminación de semianticuerpos de las preparaciones de IgG.
- 45 10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el uso es para la eliminación de agregados del anticuerpo y oligómeros del anticuerpo de las preparaciones de IgG.
- 50 11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico del polipéptido de fusión, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo triespecífico del polipéptido de fusión o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tetraespecífico del polipéptido de fusión.

Figura 1

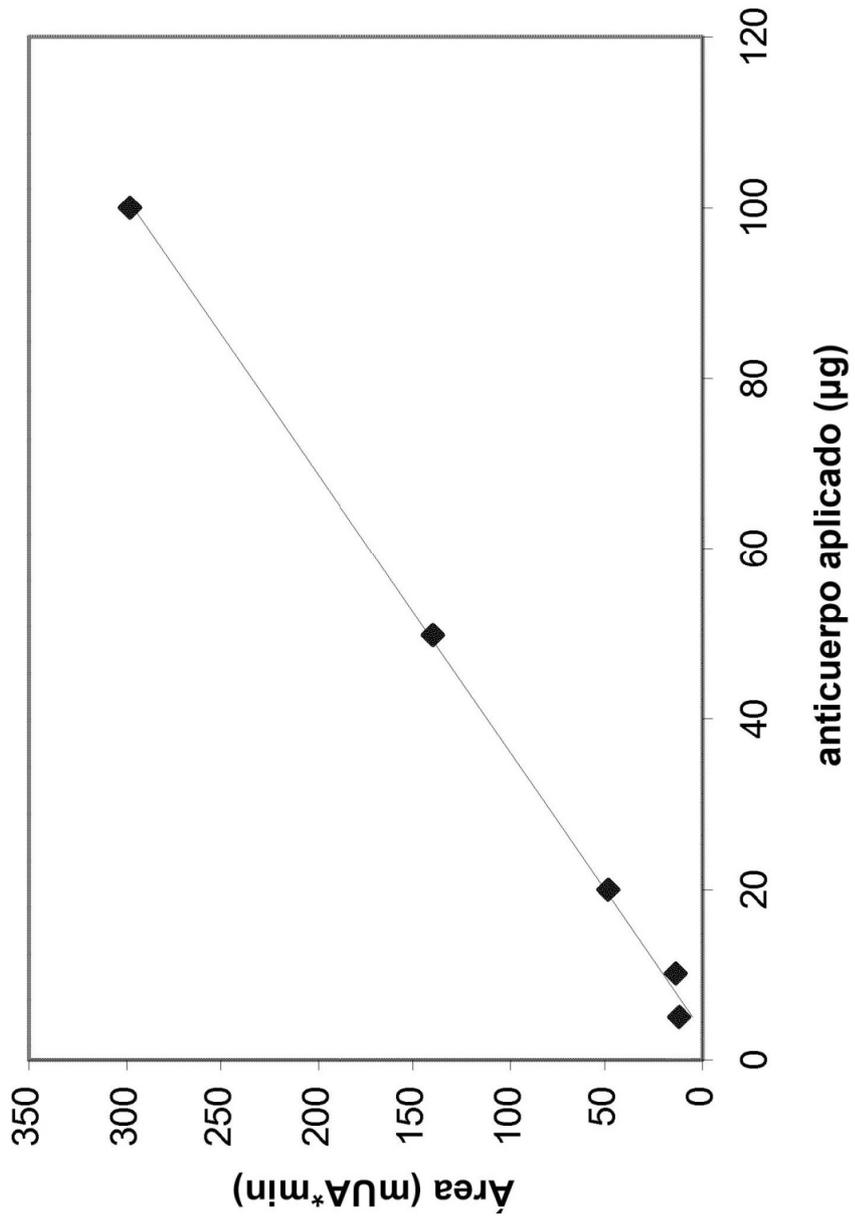


Figura 2

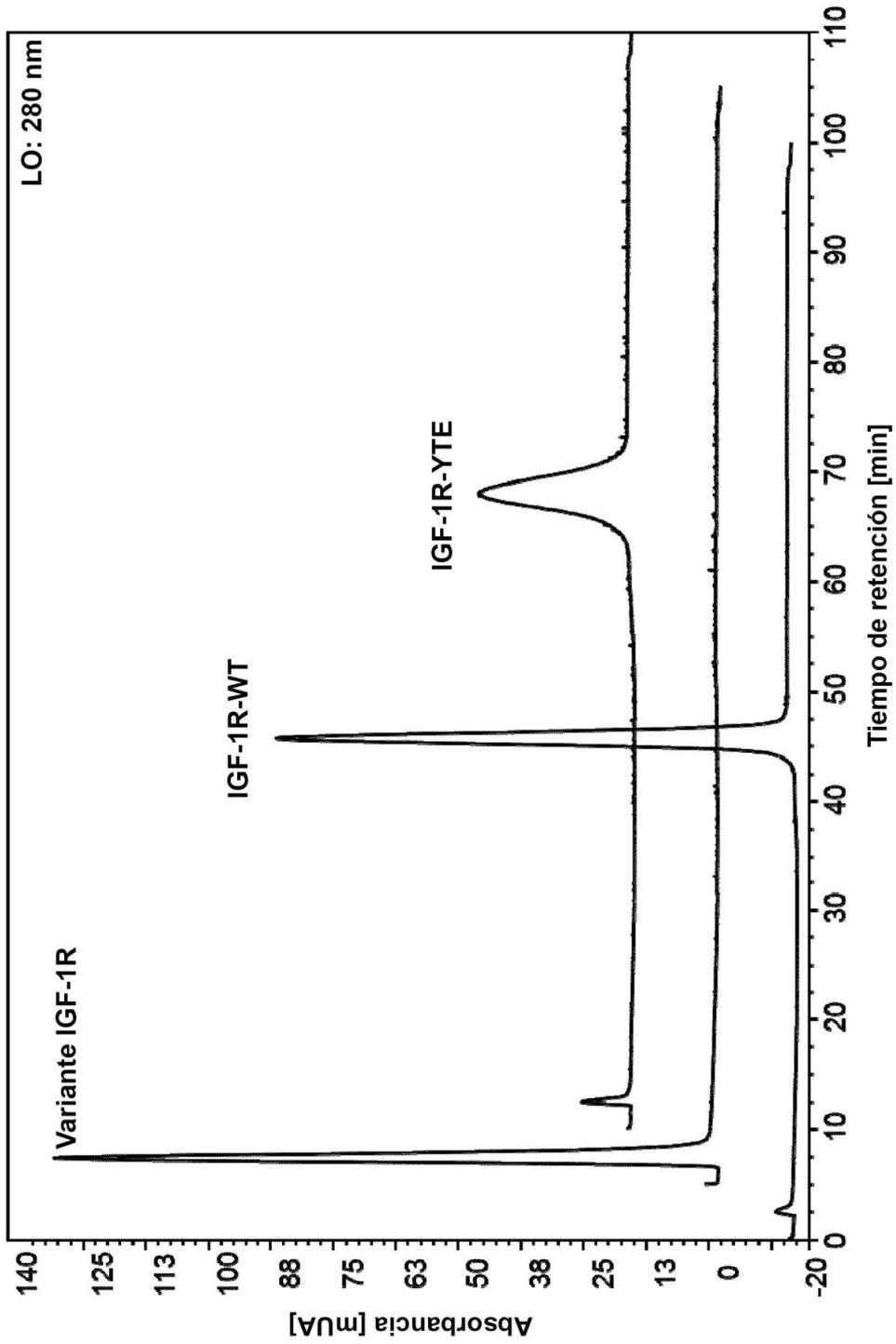


Figura 3

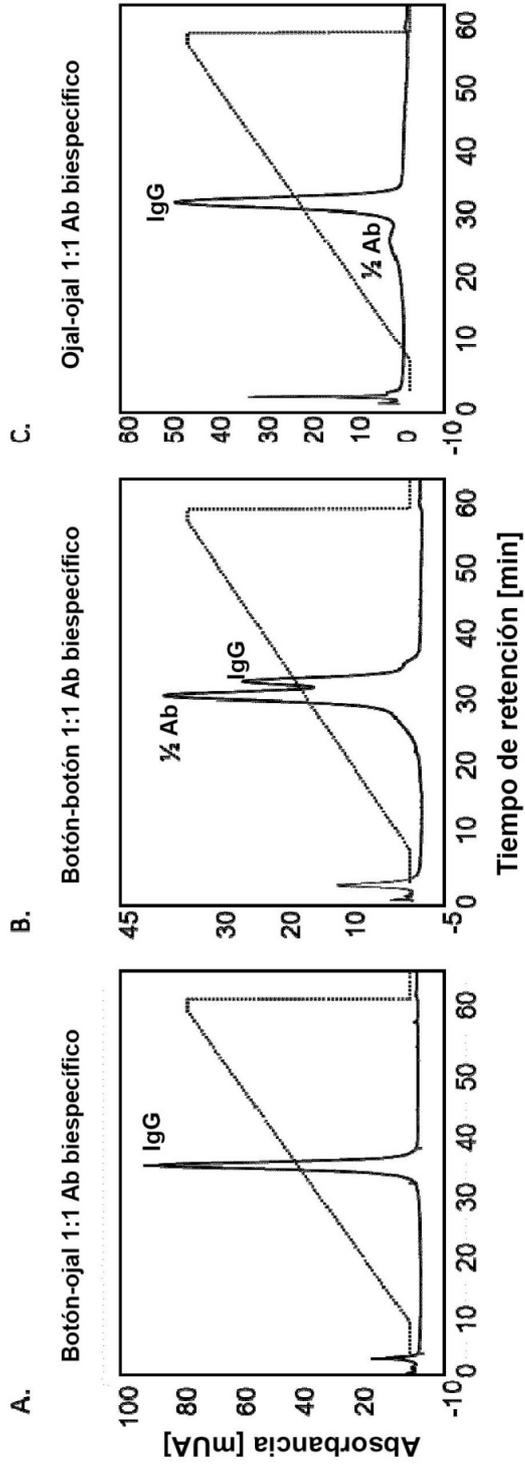
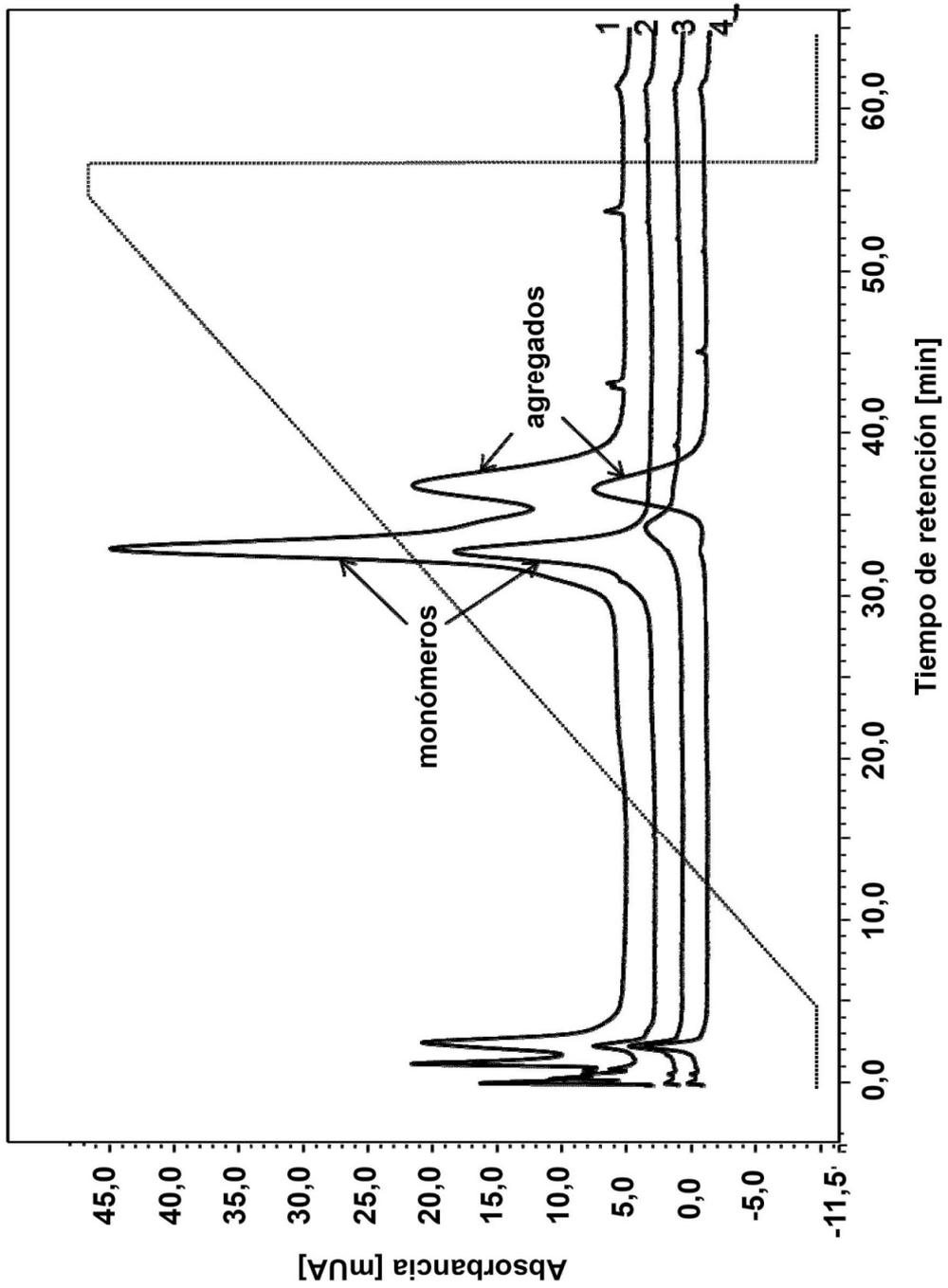


Figura 4



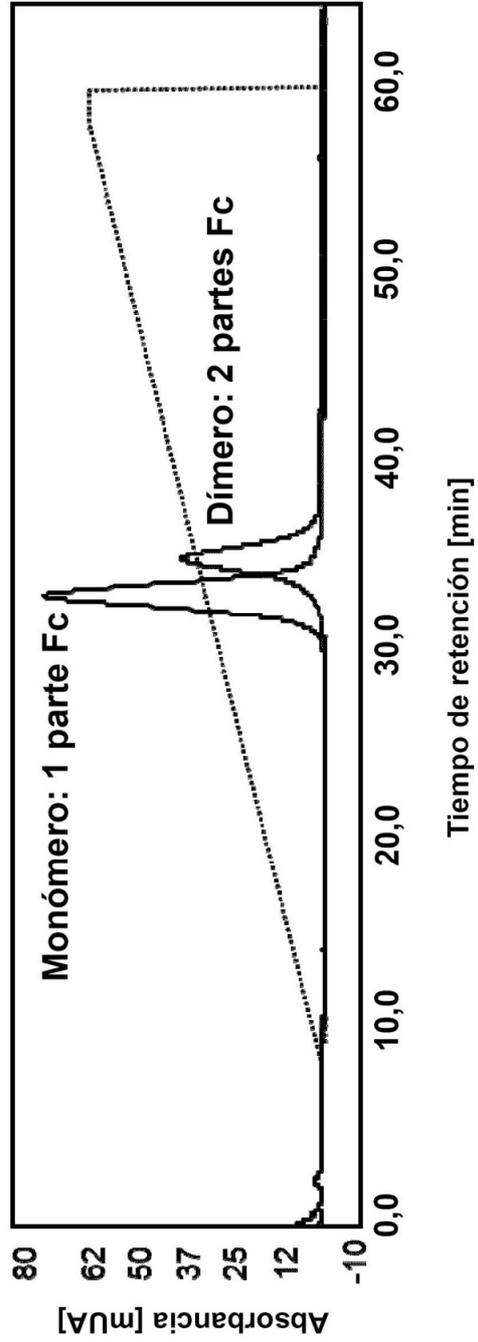
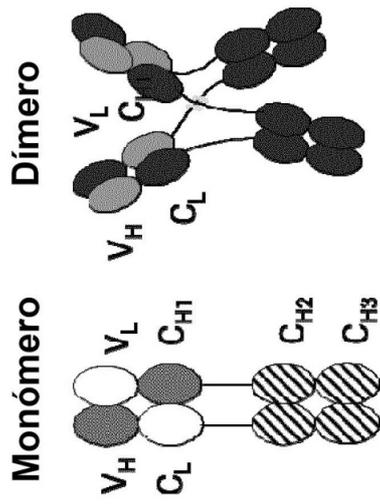


Figura 5

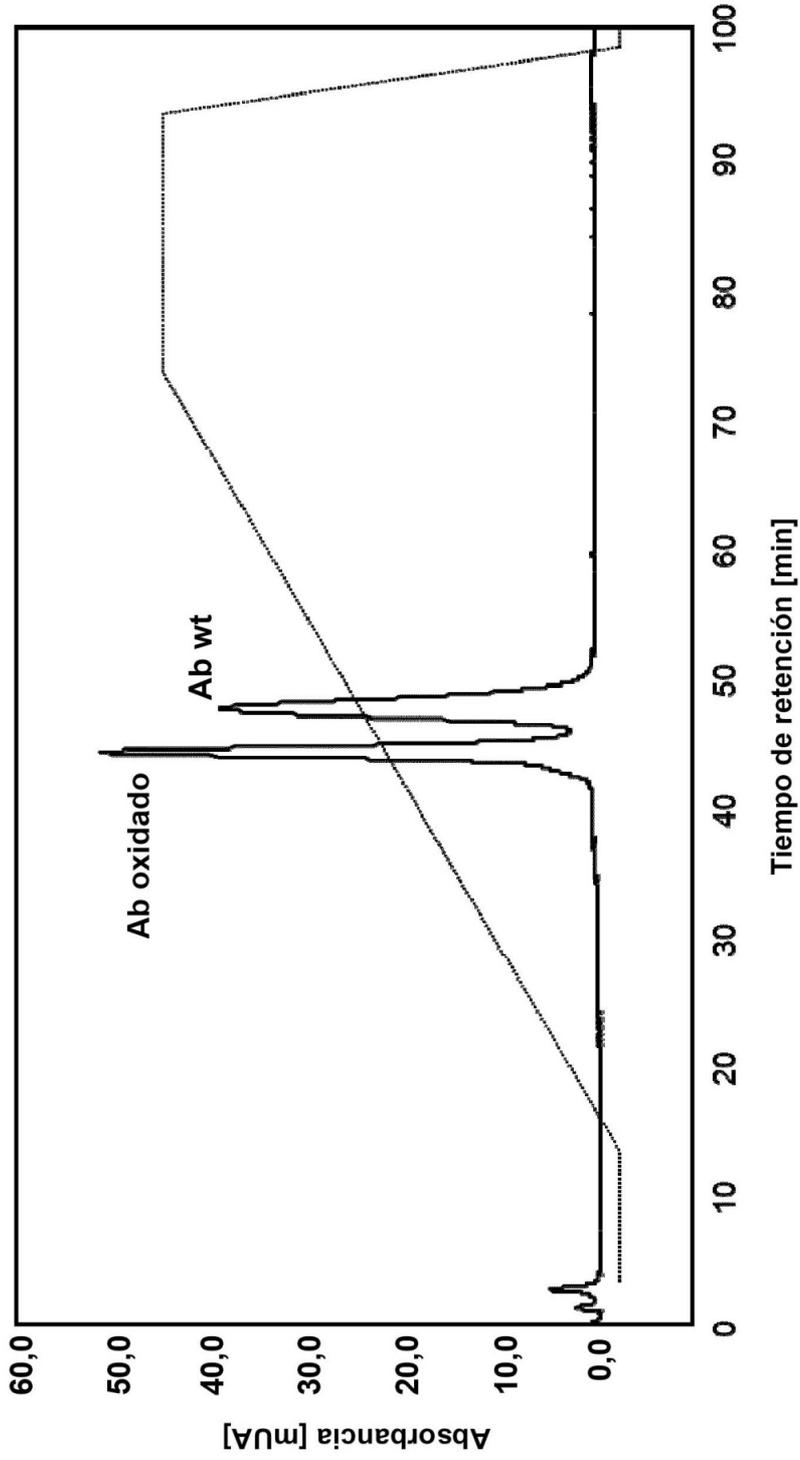
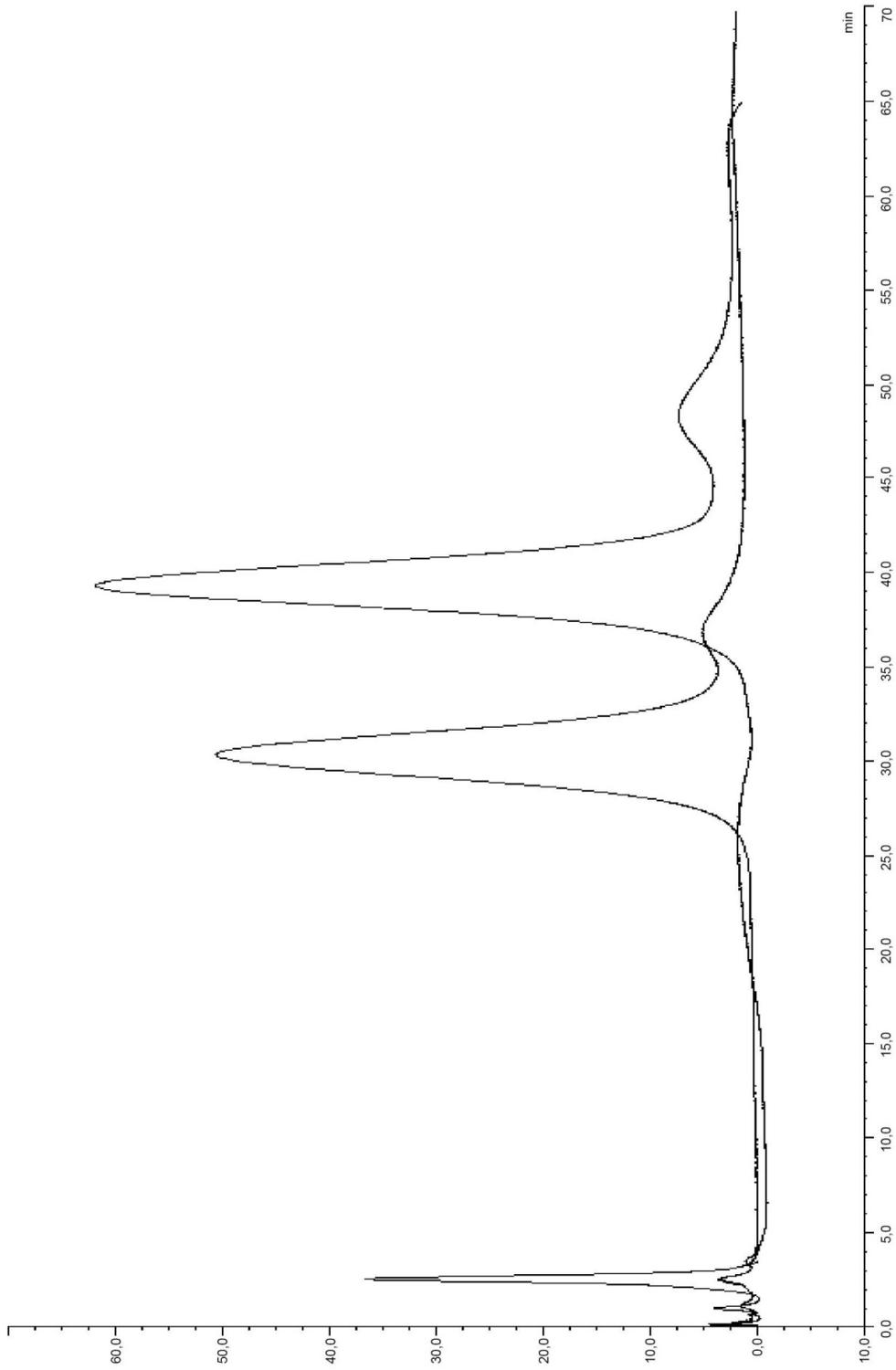


Figura 6

Figura 7



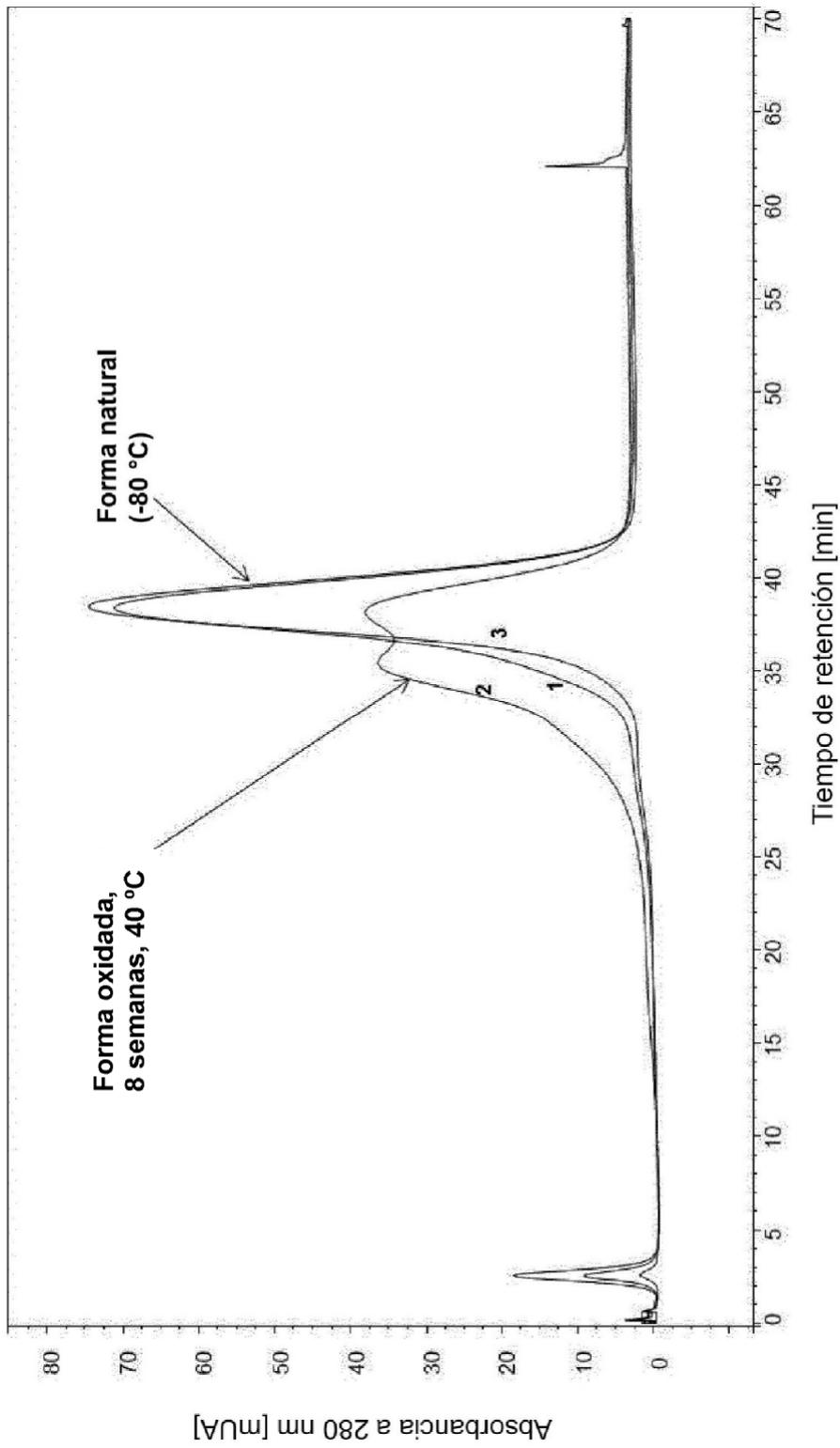


Figura 8

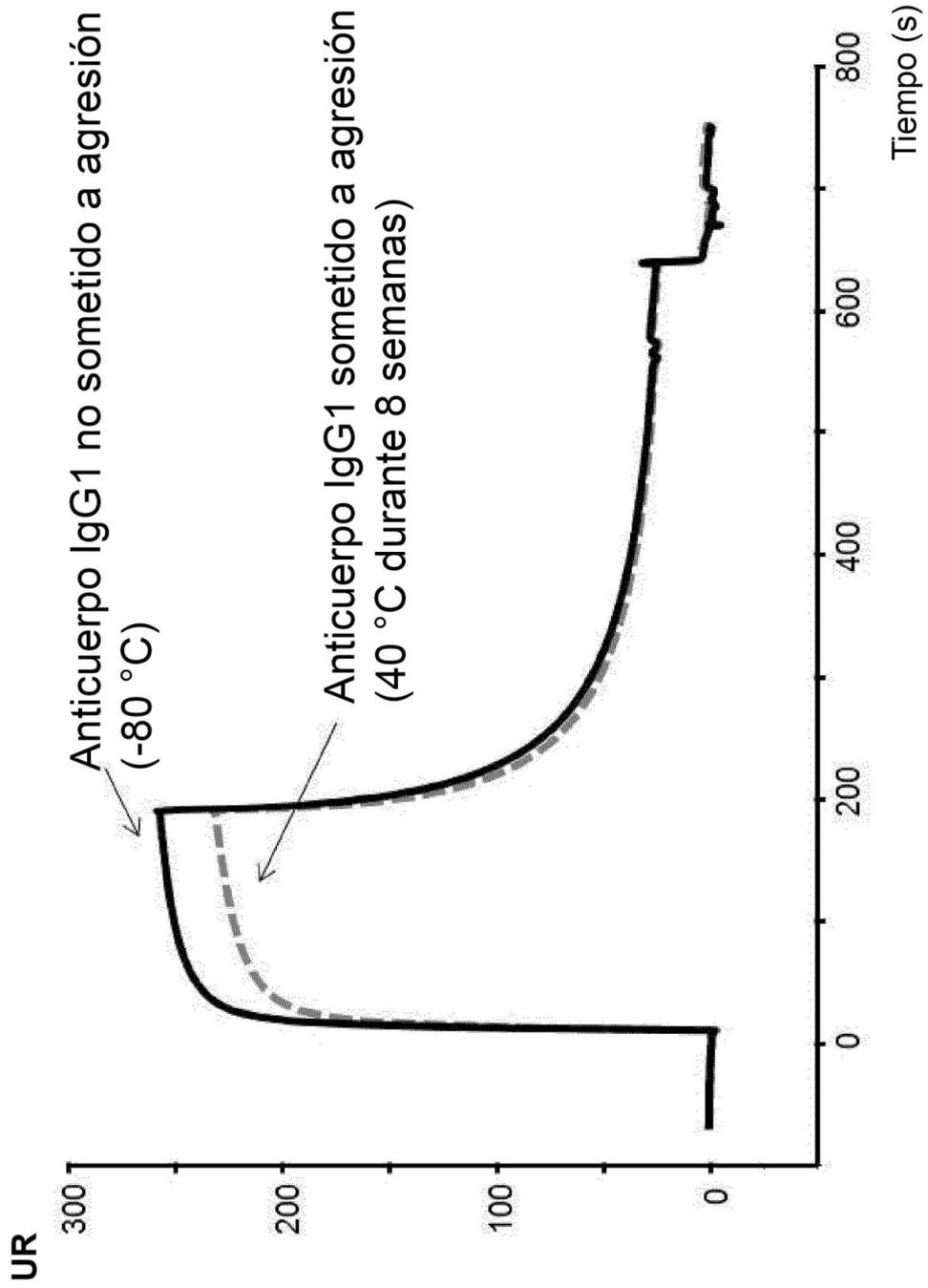


Figura 9

Figura 10

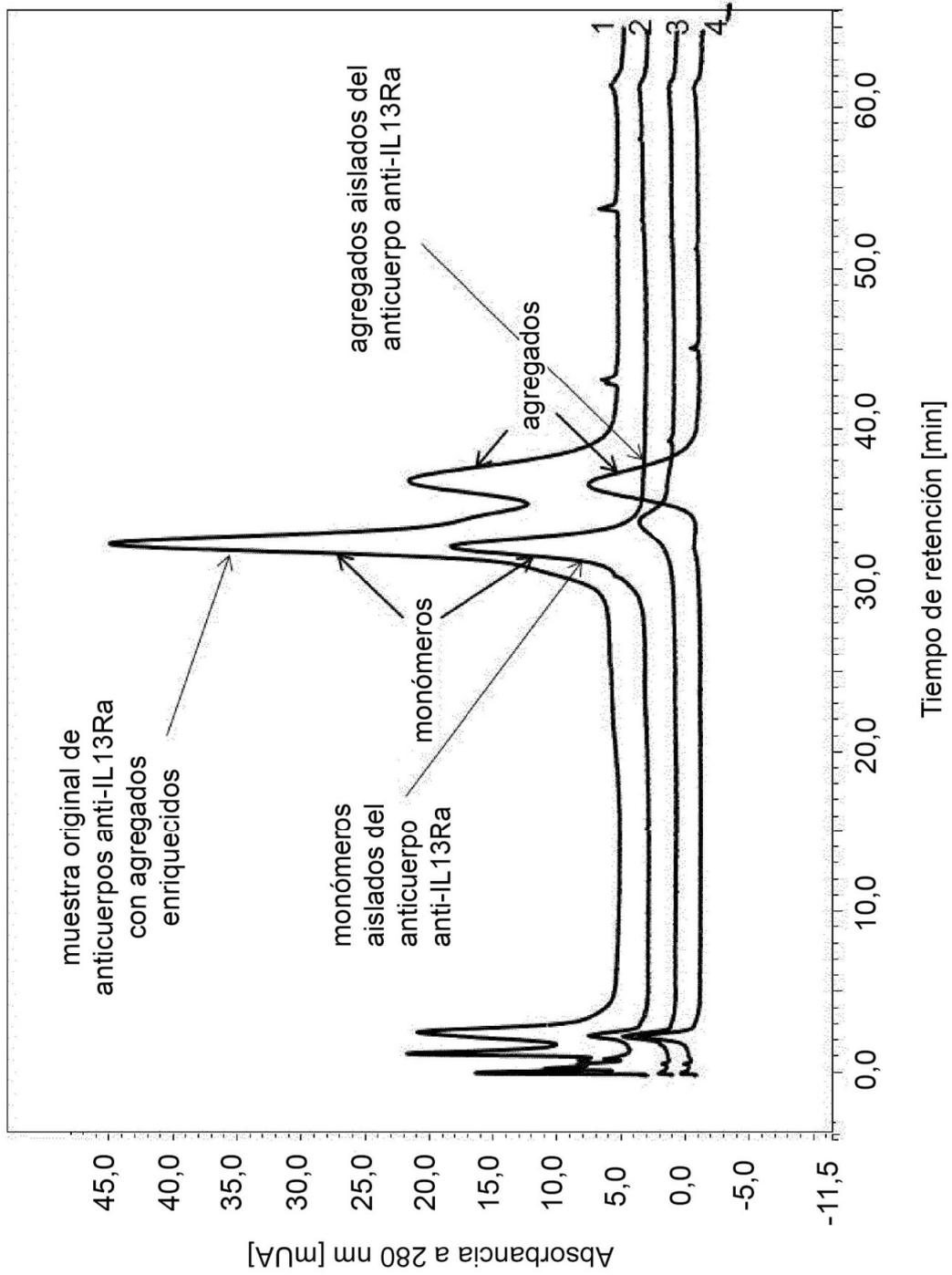


Figura 11

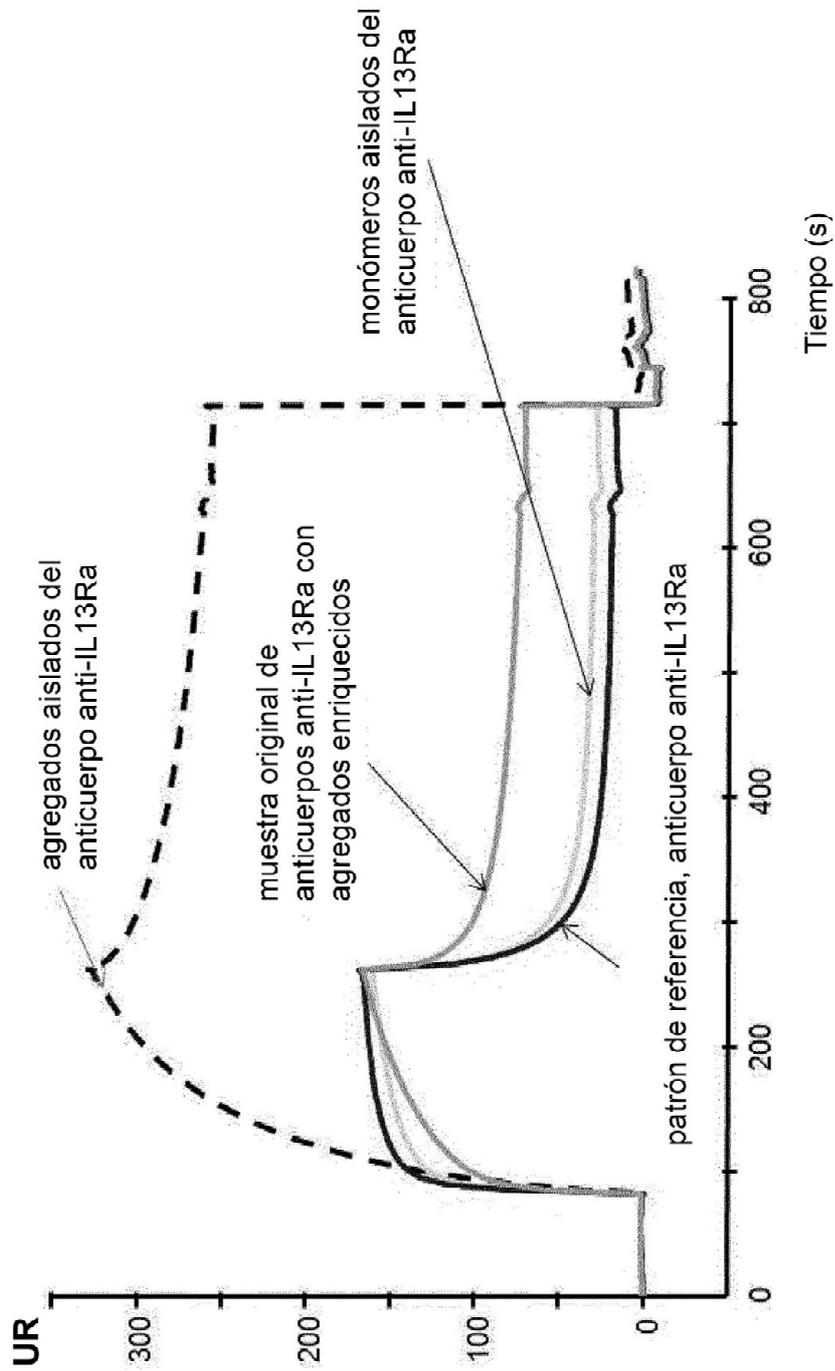
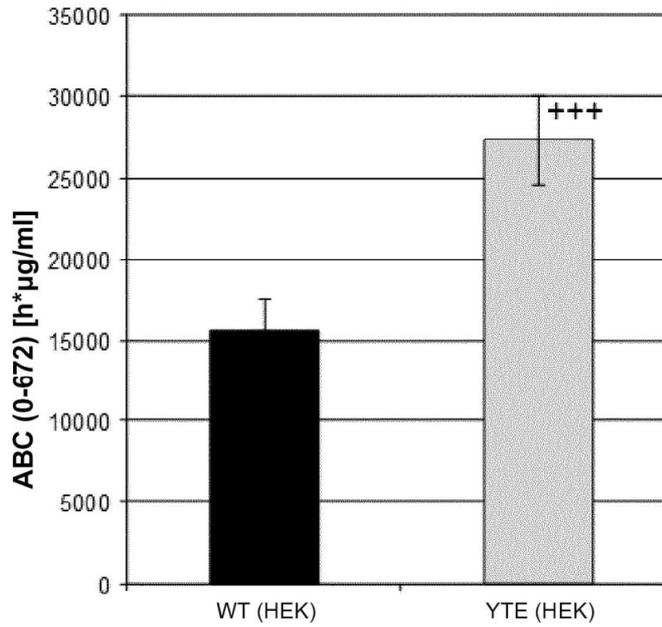


Figura 12

ABC (0-672)



semivida terminal

