

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 268**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2012 PCT/EP2012/055393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2012 E 12710732 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2691417**

54 Título: **Variantes de Fc de anticuerpo**

30 Prioridad:

29.03.2011 EP 11160251

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

03.12.2018

73 Titular/es:

ROCHE GLYCART AG (100.0%)

Wagistrasse 18

8952 Schlieren-Zuerich, CH

72 Inventor/es:

BAEHNER, MONIKA;

JENEWEIN, STEFAN;

KUBBIES, MANFRED;

MOESSNER, EKKEHARD y

SCHLOTHAUER, TILMAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 692 268 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

Variantes de Fc de anticuerpo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden variantes de una región Fc. Más particularmente, la presente invención se refiere a polipéptidos que contienen región Fc que presentan una función efectora alterada con consecuencia de una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del polipéptido.

10

Descripción resumida

La presente invención se refiere al campo de las variantes de anticuerpo y proporciona polipéptidos que comprenden variantes de Fc con una función efectora reducida, tal como una ADCC y/o unión de C1q reducidas. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

15

En particular, la invención proporciona un polipéptido que comprende una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, en el que dicha variante de Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición Pro329 y por lo menos una sustitución de aminoácido adicional, en el que los residuos se numeran según el índice EU de Kabat, y en el que dicho polipéptido muestra una afinidad reducida para FcγRIIIA humana y/o FcγRIIA y/o FcγRI en comparación con un polipéptido que comprende la región Fc de IgG de tipo salvaje, y en el que la ADCC inducida por dicho polipéptido se reduce a por lo menos 20% de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje.

20

En una realización específica, Pro329 de una región Fc humana de tipo salvaje en el polipéptido indicado anteriormente se sustituye por glicina, destruyendo el sándwich de prolina dentro de la interfaz de receptores Fc/Fcγ que se forma entre la prolina329 del Fc y los residuos de triptófano Trp87 y Trp110 de FcγRIII (Sondermann et al., Nature 406:267-273, 20 de julio de 2000), con las sustituciones de aminoácidos adicionales L234A y L235A de la región Fc de la IgG1 humana.

25

30

En otro aspecto de la invención, el polipéptido proporcionado muestra una afinidad reducida para por lo menos un receptor adicional del grupo que comprende los receptores humanos FcγI, FcγIIA y C1q en comparación con el polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. El polipéptido comprende una región Fc de IgG1 humana y el polipéptido es un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc.

35

En una realización adicional, la agregación de trombocitos inducida por el polipéptido que comprende la variante de Fc es reducida en comparación con la agregación de trombocitos inducida por un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En una realización todavía adicional, el polipéptido según la invención muestra una CDC fuertemente reducida en comparación con la CDC inducida por un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje.

40

En otra realización de la invención, se proporcionan polipéptidos que comprenden una variante de Fc, tal como se ha indicado anteriormente, para la utilización como medicamento. En una realización específica, el polipéptido es un anticuerpo anti-CD9, que se caracteriza porque el polipéptido que comprende la región Fc de tipo salvaje comprende como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 9, y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 8.

45

En otro aspecto de la invención, los polipéptidos tal como se ha indicado anteriormente se proporcionan para la utilización en el tratamiento de una enfermedad en la que resulta favorable que una función efectora del polipéptido que comprende la variante de Fc se encuentre fuertemente reducida en comparación con la función efectora inducida por un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje.

50

En otra realización, la utilización de los polipéptidos tal como se ha indicado anteriormente para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, en el que resulta favorable que la función efectora del polipéptido que comprende la variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje se encuentra fuertemente reducida en comparación con la función efectora inducida por un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje.

55

Se da a conocer además un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad, en la que resulta favorable que la función efectora del polipéptido que comprende una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje se encuentra fuertemente reducida en comparación con la función efectora inducida por un polipéptido que comprende un polipéptido Fc humano de tipo salvaje, que comprende administrar en un individuo una cantidad eficaz del polipéptido indicado anteriormente.

60

Un aspecto adicional de la invención es la utilización de un polipéptido que comprende una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, en el que, en dicho polipéptido Pro329 de la región Fc de IgG humana se ha sustituido por glicina, en el que los residuos están numerados según el índice EU de Kabat, en el que dicho polipéptido

65

muestra una afinidad reducida para FcγRIIIA and FcγRIIA humanas para la modulación negativa de la ADCC a por lo menos 20% de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende la región Fc de IgG humana de tipo salvaje y/o para la modulación negativa de la ADCP.

5 Otro aspecto de la invención es la utilización de un polipéptido que comprende una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, en el que, en dicho polipéptido Pro329 de la región Fc de IgG humana se ha sustituido por glicina y en el que la variante de Fc comprende por lo menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana, en la que los residuos están numerados según el índice EU de Kabat, en el que dicho polipéptido muestra una afinidad reducida para FcγRIIIA and FcγRIIA humanas para la modulación negativa de la ADCC a por lo menos 20% de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende la región Fc de IgG humana de tipo salvaje y/o para la modulación negativa de la ADCP.

15 Otro aspecto de la invención es la utilización del polipéptido indicado anteriormente, en el que la agregación de trombocitos inducida por el polipéptido indicado anteriormente es reducida respecto a la agregación de trombocitos inducida por un polipéptido que comprende una región Fc humana de tipo salvaje, en el que el polipéptido es un anticuerpo activador de plaquetas.

20 Se da a conocer además un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad, en el que dicho individuo se trata con un polipéptido, en el que, en dicho polipéptido Pro239 de la región Fc de IgG humana ha sido sustituido por glicina, en el que los residuos están numerados según el índice EU de Kabat, en el que dicho polipéptido se caracteriza por una unión fuertemente reducida a FcγRIIIA y/o FcγRIIA en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de dicho polipéptido.

25 Antecedentes

Los anticuerpos monoclonales presentan un gran potencial terapéutico y desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Durante la última década, una tendencia significativa en la industria farmacéutica ha sido el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb) como agentes terapéuticos para el tratamiento de varias enfermedades, tales como cánceres, asma, artritis, esclerosis múltiple, etc. Los anticuerpos monoclonales se fabrican predominantemente como proteínas recombinantes en cultivo de células de mamífero genéticamente manipuladas.

35 La región Fc de un anticuerpo, es decir, los extremos de las cadenas pesadas de los dominios de anticuerpo CH2, CH3 y una parte de la región bisagra, presenta una variabilidad limitada y participa en las funciones fisiológicas desempeñadas por el anticuerpo. Las funciones efectoras atribuibles a la región Fc de un anticuerpo varían con la clase y subclase del anticuerpo e incluyen la unión del anticuerpo mediante la región Fc a un receptor de Fc específico ("FcR") sobre una célula que induce diversas respuestas biológicas.

40 Estos receptores típicamente presentan un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región transmembranal y un dominio intracelular que puede mediar en algunos sucesos de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una diversidad de células inmunológicas, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T. La formación del complejo Fc/FcγR atrae estas células efectoras a sitios de antígeno unido, resultando típicamente en sucesos de señalización dentro de las células y a importantes respuestas inmunológicas posteriores, tales como la liberación de mediadores de inflamación, la activación de células B, la endocitosis, la fagocitosis y el ataque citotóxico. La capacidad de mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial por el que los anticuerpos destruyen las células diana. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen los anticuerpos unidos sobre una célula diana y seguidamente provocan la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (Ravetch et al., Annu. Rev. Immunol. 19:275-290, 2001). La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen los anticuerpos unidos sobre una célula diana y seguidamente provocan la fagocitosis se denomina fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés). Además, un sitio solapante en la región Fc de la molécula también controla la activación de una función citotóxica independiente de células mediada por el complemento, también conocido como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

55 Para la clase IgG de anticuerpos, la ADCC y la ADCP están controladas por el acoplamiento de la región Fc con una familia de receptores denominada receptores de Fcγ (FcγR). En el ser humano, esta familia de proteínas comprende FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIA y FcγRIIIB (Raghavan y Bjorkman, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12:181-220, 1996; Abes et al., Expert Reviews 5(6):735-747, 2009). Los FcγR se expresan sobre una diversidad de células inmunológicas y la formación del complejo Fc/FcγR atrae estas células a sitios de antígeno unido, resultando típicamente en sucesos de señalización y posteriores respuestas inmunológicas, tales como la liberación de mediadores de inflamación, la activación de células B, la endocitosis, la fagocitosis y el ataque citotóxico. Además, mientras que FcγRI, FcγRIIA/c y FcγRIIIA son receptores activadores caracterizados por un motivo de activación intracelular a base de tirosina de inmunorreceptores (ITAM, por sus siglas en inglés), FcγRIIB presenta un motivo de inhibición (ITIM) y es, por lo tanto, inhibidor. Además,

de Reys et al., Blood 81:1792-1800, 1993, han concluido que la activación y agregación plaquetarias inducidas por anticuerpos monoclonales, como, por ejemplo, CD9, se inicia mediante el reconocimiento de antígenos, seguido de una etapa dependiente de dominio Fc, que implica el receptor FcγRII (ver también Taylor et al., Blood 96:4254-4260, 2000). Aunque FcγRI se une a la IgG monomérica con alta afinidad, FcγRIII y FcγRII son afinidades de baja afinidad, que interactúan con IgG acomplejado o agregado.

La cascada inflamatoria del complemento es una parte de la respuesta inmunológica innata y resulta crucial para la capacidad de un individuo de rechazar una infección. Otro importante ligando de Fc es la proteína del complemento C1q. La unión de Fc a C1q media en un proceso denominado citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q es capaz de unir seis anticuerpos, aunque la unión de dos IgG resulta suficiente para activar la cascada del complemento. C1q forma un complejo con las Clr y Cls serina proteasas, formando el complejo C1 de la ruta del complemento.

Bajo muchas circunstancias, la unión y estimulación de las funciones efectoras mediadas por la región Fc de las inmunoglobulinas resulta altamente beneficiosa, p.ej. para un anticuerpo de CD20; sin embargo, en determinados casos puede resultar más ventajoso reducir o incluso eliminar la función efectora. Ello es particularmente cierto para aquellos anticuerpos diseñados para administrar un fármaco (p.ej., toxinas e isótopos) con diana en las células en las que las funciones efectoras mediadas por Fc/FcγR llevan células inmunológicas sanas a la proximidad de la carga letal, resultando en la eliminación de tejido linfóide normal junto con las células diana (Hutchins et al., PNAS USA 92:11980-11984, 1995; White et al., Annu. Rev. Med. 52:125-145, 2001). En estos casos, la utilización de anticuerpos que atraen poco al complemento o a células efectoras resultaría enormemente beneficiosa (ver también Wu et al., Cell Immunol. 200:16-26, 2000; Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604, 2001; patentes US nº 6.194.551, nº 5.885.573 y publicación de patente PCT nº WO 04/029207).

En otros casos, por ejemplo en donde el objetivo es bloquear la interacción de un receptor ampliamente expresado con su ligando afín, resultaría ventajoso reducir o eliminar completamente la función efectora del anticuerpo para reducir la toxicidad no deseada. Además, en el caso en que un anticuerpo terapéutico muestra una unión promiscua en varios tejidos humanos, resultaría prudente limitar dirigir la función efectora a un conjunto diverso de tejidos para limitar la toxicidad. Finalmente, aunque no por ello menos importante, la afinidad reducida de los anticuerpos contra el receptor FcγRII en particular resultaría ventajoso para anticuerpos que inducen la activación y agregación plaquetarias mediante la unión del receptor FcγRII, que sería un efecto secundario grave de dichos anticuerpos.

Aunque existen determinadas subclases de inmunoglobulinas humanas que no presentan funciones efectoras específicas, no existen inmunoglobulinas naturales carentes de todas las funciones efectoras. Un enfoque alternativo sería manipular o mutar los residuos críticos en la región Fc que son responsables de la función efectora. Por ejemplo, ver las publicaciones de patente PCT nº WO 2009/100309 (Medimmune), el documento nº WO 2006/076594 (Xencor), el documento nº WO 1999/58572 (Univ. Cambridge), el documento nº US 2006/0134709 (Macrogenics), el documento nº WO 2006/047350 (Xencor), el documento nº WO 2006/053301 (Xencor), la patente nº US 6.,737.056 (Genentech), la patente nº US 5.624.821 (Scotgen Pharmaceuticals) y el documento nº US 2010/0166740 (Roche).

La unión de IgG a los receptores de Fcγ activadores e inhibidores o al primer componente del complemento (C1q) depende de los residuos situados en la región bisara y en el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para los FcγR y la unión del complemento C1q y presentan secuencias únicas. La sustitución de los residuos de IgG1 e IgG2 humanas en las posiciones 233 a 236 y de residuos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reduce en gran medida la ADCC y CDC (Armour et al., Eur. J. Immunol. 29(8):2613-2624, 1999; Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604, 2001). Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575, 2000, han localizado el sitio de unión de C1q para el rituxán y han demostrado que Pro329Ala reduce la capacidad del Rituximab de unirse a C1q y de activar el complemento. La sustitución de Pro329 por Ala se ha informado de que conduce a una unión reducida a los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIIIA (Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604, 2001) pero esta mutación también se ha descrito como mostrando una unión similar a la del tipo salvaje a FcγRI y FcγRII y sólo una muy pequeña reducción de la unión al receptor FcγRIIIA (Tablas 1 y 2 en la patente nº EP 1.068.241, Genentech). El documento nº US2008/0274105A también describe la mutación P329A de Fc.

Oganesyan et al., Acta Crystallographica D64:700-704, 2008, introdujeron la triple mutación L234F/L235E/P331S en la bisagra inferior y dominio C2H y demostraron una reducción de la actividad de unión de moléculas IgG1 humanas a receptor de C1q humano, FcγRI, FcγRII y FcγRIIIA.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad no satisfecha de anticuerpos con una ADCC y/o ADCP y/o CDC fuertemente reducidas. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es identificar dichos anticuerpos. Inesperadamente, se ha encontrado que la mutación del residuo de prolina en Pro329 a glicina resulta en una inesperada fuerte inhibición de los receptores FcγRIIIA y FcγRIIA y en una fuerte inhibición de la ADCC y la CDC. Además, la mutación combinada de Pro329 y, por ejemplo, L234A y L235A (LALA) conduce a una inesperada inhibición fuerte de C1q, FcγRI, FcγRII y FcγRIIIA. De esta manera, un residuo de glicina aparentemente resulta inesperadamente superior a otras sustituciones de aminoácidos, como alanina, por ejemplo, en la posición 329, en la destrucción del sándwich de prolina en la interfaz de receptores de Fc/Fcγ.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 Se midieron las afinidades de unión de diferentes FcγR para las inmunoglobulinas mediante resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) utilizando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) a 25°C.

10 a) Se sometió a ensayo la afinidad de unión de FcγRI para las variantes de anticuerpo GA101 (GA) (mutaciones IgG1-P329G, IgG4-SPLE e IgG1-LALA) y para las variantes de anticuerpo de P-selectina (PS) (IgG1-P329G, IgG-LALA y IgG4-SPLE), así como para los anticuerpos de tipo salvaje.

b) La afinidad de unión a FcγRI se sometió a ensayo para variantes de anticuerpo de CD9 (IgG1-tipo salvaje, IgG1-P329G, IgG1-LALA, IgG4-SPLE, IgG1-P329G/LALA, IgG4-SPLE/P329G), así como para los anticuerpos de tipo salvaje.

15 c) La afinidad de unión a FcγRIIA(R131) se sometió a ensayo para variantes de anticuerpo de CD9 (IgG1-tipo salvaje, IgG1-P329G, IgG1-LALA, IgG4-SPLE, IgG1-P329G/LALA, IgG4-SPLE/P329G), así como para los anticuerpos de tipo salvaje. Se muestra una respuesta normalizada como función de la concentración del receptor

d) Se sometió a ensayo la afinidad de unión de FcγRIIB para las variantes de anticuerpo CD9 (denominada en la presente memoria: "TA") (IgG1-tipo salvaje, IgG4-SPLE/P329G, IgG1-LALA, IgG1-LALA/P329G) y para las variantes de anticuerpo de P-selectina (pSel) (IgG4-tipo salvaje, IgG4-SPLE), así como para los anticuerpos de tipo salvaje.

20 e) Se sometió a ensayo la afinidad de unión para FcγPIIIA-V158 para variantes del anticuerpo C9 (IgG1-tipo salvaje, IgG4-SPLE, IgG1-LALA, IgG4-SPLE/P329G, IgG1-P329G, IgG1-LALA/P329G), así como para los anticuerpos de tipo salvaje. Se muestra una respuesta normalizada como función de la concentración del receptor.

25 Figura 2

Se sometió a ensayo la unión de C1q para las variantes de anticuerpo de P-selectina (PS) (IgG1 de tipo salvaje, P329G, IgG4-SPLE) y variantes de anticuerpo CD20 (GA) (IgG1-tipo salvaje, P329G e IgG4-SPLE).

30 Figura 3

La potencia de atraer células efectoras inmunológicas depende del tipo de variante de Fc. Se utilizaron las variantes de Fc para recubrir una placa ELISA y se añadieron células efectoras NK92 humanas transfectadas con FcγRIIIA humano. Se midió la inducción de la actividad citolítica de las células NK activadas utilizando un ensayo de esterasa.

35 a) Se analizaron las variantes de anticuerpo CD20 (GA101) (tipo salvaje, LALA, P329G/LALA). b) Se analizaron las variantes de anticuerpo CD20 (GA101) (con mutaciones P329R o P329G introducidas). Todas las variantes se produjeron en la versión glucomanipulada con el fin de obtener una señal más fuerte de cualquier función de atracción de células efectoras.

40 Figura 4

45 La potencia de atraer células efectoras inmunológicas depende del tipo de variante de Fc, según se mide mediante un ensayo de ADCC clásico. La línea celular NK92 humana transfectada con FcγRIIIA humano se utilizó como efector y se utilizaron células Raji positivas para CD20 como células diana. Se sometieron a ensayo diferentes variantes de anticuerpo CD20 glucomanipulado (GA101 G(2) y de anticuerpo CD20 no glucomanipulado (GA101) (mutaciones P329G, P329A o LALA introducidas).

50 a) Anticuerpo CD20 no glucomanipulado: se introdujeron las mutaciones P329G, LALA y P329G/LALA, respectivamente, en el anticuerpo, respectivamente.

b) Anticuerpo CD20 glucomanipulado: se introdujeron las mutaciones P329G, P329A y LALA, respectivamente, en el anticuerpo, respectivamente.

55 Figura 5

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las diferentes variantes de Fc de un anticuerpo CD20 (GA101) no glucomanipulado y glucomanipulado se analizaron para su eficacia en la medicación de la CDC sobre las células diana SUDH-L4.

60 a) CD20 no glucomanipulado: se introdujeron las mutaciones P329G, LALA y P329G/LALA, respectivamente, en el anticuerpo, respectivamente.

b) CD20 glucomanipulado: se introdujeron las mutaciones P329G, P329A y LALA, respectivamente, en el anticuerpo, respectivamente.

65 Figura 6

- 5 a) Perfil de carbohidratos de glicanos asociados a Fc de variantes de IgG1 humanas. El porcentaje de galactosilación de los oligosacáridos asociados a Fc de IgG1_h que contiene las mutaciones LALA, P329G, P329A o P329G/LALA sólo difiere mínimamente del porcentaje en el anticuerpo de tipo salvaje.
- b) Galactosilación relativa: cuatro IgG diferentes con mutaciones P329G/LALA de IgG1 introducidas. Se compararon cuatro dominios V diferentes para su nivel de galactosilación al expresarlos en células Hek293 EBNA.

Figura 7

10 Agregación plaquetaria inducida por anticuerpos en ensayo de sangre completa. Agregación plaquetaria inducida por IgG1 murina según se determinó para dos donantes que diferían en su respuesta según la concentración del anticuerpo.

- 15 a) Donante a, b) donante B.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

20 En la presente memoria y en las reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU, tal como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de los residuos del anticuerpo IgG1 EU humano.

25 El término "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo un antígeno o un receptor de Fc). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo anticuerpo/receptor de Fc o anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su pareja Y puede representarse de manera general con la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos de la técnica, incluyendo los indicados en la presente memoria. A continuación, se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para la medición de la afinidad de unión.

35 Un anticuerpo "de afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (RHV), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, resultando dichas alteraciones en una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

40 Una "modificación de aminoácido" se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Entre las modificaciones ejemplares se incluyen una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido. La modificación de aminoácido preferente en la presente memoria es una sustitución. Una "modificación de aminoácido en" una posición especificada, p.ej. de la región Fc, se refiere a la sustitución o delección del residuo especificado, o la inserción de por lo menos un residuo aminoácido contiguo al residuo especificado. Una inserción "contigua" a un residuo específico se refiere a una inserción a uno o dos residuos de dicho residuo específico. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal respecto al residuo especificado.

50 Una "sustitución de aminoácido" se refiere al reemplazamiento de por lo menos un residuo aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada por otro residuo aminoácido "de sustitución". El residuo o residuos de sustitución pueden ser "residuos aminoácidos naturales" (es decir, codificados en el código genético) y seleccionados del grupo que consiste en alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y valina (Val). Preferentemente, el residuo de sustitución no es cisteína. La sustitución con uno o más residuos aminoácidos no naturales también se encuentra comprendida en la definición de una sustitución de aminoácido en la presente memoria. Un "residuo aminoácido no natural" se refiere a un residuo, diferente de los residuos aminoácidos naturales indicados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente uno o más residuos aminoácidos contiguos en una cadena polipeptídica. Entre los ejemplos de residuos aminoácidos no naturales se incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuo aminoácido, tales como los indicados en Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336, 1991. Para generar dichos residuos aminoácidos no naturales, pueden utilizarse los procedimientos de Noren et al., Science 244:182, 1989, y Ellman et al., *supra*. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un residuo aminoácido no natural, seguido de la transcripción y traducción in vitro del ARN.

65 Una "inserción de aminoácido" se refiere a la incorporación de por lo menos un aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Aunque la inserción habitualmente consistirá en la inserción de uno o dos residuos aminoácidos, la presente solicitud contempla "inserciones peptídicas" más grandes, p.ej. la inserción de entre

aproximadamente tres y aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez residuos aminoácidos. El residuo o residuos insertados pueden ser naturales o no naturales, tal como se ha dado a conocer anteriormente.

5 Una "delección de aminoácido" se refiere a la eliminación de por lo menos un residuo aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

10 El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

15 La expresión "variante de anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una variante de un anticuerpo de tipo salvaje, caracterizado porque se ha producido una alteración de la secuencia de aminoácidos respecto al anticuerpo de tipo salvaje en la variante de anticuerpo, p.ej. Introducida mediante mutación de residuos aminoácidos específicos en el anticuerpo de tipo salvaje.

20 La expresión "una o más funciones efectoras de anticuerpo" o "función efectora" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una función a la que contribuye uno o más dominios efectoros Fc de una IgG (p.ej., la región Fc de una inmunoglobulina). Dicha función puede ser realizada mediante, por ejemplo, la unión de uno o más dominios efectoros Fc a un receptor de Fc sobre una célula inmunológica con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de uno o más dominios efectoros Fc a componentes del sistema del complemento. Las funciones efectoras típicas son ADCC, ADCP y CDC.

25 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto, que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

30 Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más. En la presente memoria se proporciona un ensayo ejemplar de competición.

35 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción celular en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcR (p.ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y seguidamente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991.

40 La expresión "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" y "ADCP" se refieren a un procedimiento por el que se internalizan las células recubiertas de anticuerpos, en su totalidad o en parte, por células inmunológicas fagocíticas (p.ej., macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) que se unen a una región Fc de inmunoglobulina.

45 La expresión "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una parte de una cadena polipeptídica del mismo (p.ej., la cadena α del mismo) que es responsable de la unión de una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena α de FcR.

50 La expresión "de unión" a un receptor de Fc utilizada en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a un receptor de Fc en un ensayo BIAcore(R), por ejemplo (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

55 En el ensayo BIAcore(R), el receptor de Fc se une a una superficie y la unión de la variante, p.ej. la variante de anticuerpo en la que se han introducido mutaciones, se mide mediante resonancia del plasmón superficial (RPS). La afinidad de unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/receptor de Fc), k_d (constante de disociación) y KD (k_d/k_a). Alternativamente, la señal de unión de un sensograma de RPS puede compararse directamente con la señal de respuesta de una referencia con respecto a la altura de la señal de resonancia y los comportamientos de disociación.

60 "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1: el primer componente de la ruta de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El "dominio CH₂" de la región Fc de IgG humana (también denominada dominio "Cγ₂") habitualmente se extiende entre aproximadamente el aminoácido 231 y aproximadamente el aminoácido 340.

65 El "dominio CH₂" de una región Fc de IgG humana (también denominada dominio "Cγ₂") habitualmente se extiende

entre aproximadamente el aminoácido 231 y aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es único en que no se encuentra estrechamente emparejado con otro dominio. Por el contrario, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas mediante N se interponen entre dos dominios CH2 de una molécula intacta de IgG nativa. Se ha conjeturado con que el carbohidrato podría sustituir el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2 (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206, 1985).

El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C-terminal respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, entre aproximadamente el residuo aminoácido 341 y aproximadamente la posición 447 de una IgG).

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma escamoso de pulmón, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer ovárico, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado para la misma realizado en la célula originalmente transformada. En donde se pretendan utilizar denominaciones diferentes, éstas resultarán evidentes a partir del contexto.

El término "quimérico" referido a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p.ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o bloquea una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Entre los agentes citotóxicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos (p.ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (p.ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otras agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos, antibióticos, toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer dados a conocer posteriormente.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento" o CDC se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en el que uno o más dominios Fc efectoros de un anticuerpo unido a diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de orificios en la membrana celular diana. Típicamente, los complejos de antígeno-anticuerpo tales como los presentes sobre las células diana recubiertas con anticuerpos se unen y activan el componente del complemento C1q, que, a su vez, activa la cascada del complemento, conduciendo a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también puede resultar en la deposición de componentes del complemento sobre la superficie de la célula diana que facilitan la ADCC mediante la unión de receptores del complemento (p.ej., CR3) sobre los leucocitos.

Un "trastorno" es cualquier condición que resultaría beneficiada del tratamiento con un polipéptido, como anticuerpos que comprenden una variante de Fc. Lo anterior incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos, incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En una realización, el trastorno es cáncer.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo que varían con el isotipo del anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: La unión de C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión de receptores de Fc; la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), a fagocitosis (ADCP), la regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de células B) y la activación de las células B.

Una "función efectora reducida" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una reducción de una función efectora específica, tal como, por ejemplo, la ADCC o CDC, en comparación con un control (por ejemplo un polipéptido con una región Fc de tipo salvaje) en por lo menos 20% y una "función efectora fuertemente reducida" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una reducción de una función efectora específica, como, por ejemplo, la ADCC o CDC, respecto a un control, de por lo menos 50%.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo de una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad que resulta eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

La expresión "región Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. La expresión incluye las regiones de Fc de secuencia nativa y las regiones de Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede encontrarse presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o en la región constante se lleva a cabo según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se indica en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia "nativa" o de "tipo salvaje" en virtud de por lo menos una "modificación de aminoácido" tal como se define en la presente memoria. Preferentemente, la región Fc variante presenta por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o respecto a la región Fc de un polipéptido parental, p.ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en la presente memoria preferentemente presenta una homología de por lo menos aproximadamente 80% con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y, lo más preferentemente, una homología de por lo menos aproximadamente 90% respecto a ella, más preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente 95% respecto a ella.

La expresión "variante de Fc" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una modificación en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. De esta manera, P329G es una variante Fc con la sustitución de prolina por glicina en la posición 329 respecto al polipéptido Fc parental, en el que la numeración sigue el índice EU. La identidad del aminoácido de tipo salvaje puede no estar especificada, y en este caso la variante anteriormente mencionada se denomina P329G. Para todas las posiciones comentadas en la presente invención, la numeración sigue el índice EU. El índice EU o índice EU tal como en Kabat o esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63:78-85, 1969). La modificación puede ser una adición, delección o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Las variantes pueden comprender aminoácidos no naturales. Entre los ejemplos se incluyen la patente US nº 6.586.207, los documentos nº WO 98/48032, nº WO 03/073238, nº US 2004/0214988 A1, nº WO 05/35727 A2, nº WO 05/74524 A2; Chin, J.W. et al., *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027, 2002, Chin J.W. y Schultz, P.G., *ChemBioChem* 11:1135-1137, 2002, Chin J.W. et al., *PICAS United States of America* 99:11020-11024, 2002 y Wang L. y Schultz, P.G., *Chem.* 1-10, 2002.

La expresión "polipéptido que contiene región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina (ver definiciones posteriormente), que comprende una región Fc.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de procesado alternativo de estos receptores. Entre los receptores FcγRII se incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que presentan secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor a base de tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor a base de tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. (ver revisión en Daëron M., *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234, 1997). Se proporciona una revisión de los FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34, 1994, y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41, 1995. Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, se encuentran comprendidos en el término "FcR" en la presente memoria. El término incluye además el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249, 1994).

La expresión "ligando de Fc de IgG" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula, preferentemente un polipéptido, procedente de cualquier organismo, que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando de Fc. Entre los ligandos de Fc se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los FcγR, FcγR, FcγR, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcγR vírico. Entre los ligandos de Fc se incluyen además homólogos de receptor (FcRH), que son una familia de receptores de Fc que son homólogos a los FcγR (Davis et al., Immunological Reviews 190:123-136, 2002). Entre los ligandos de Fc pueden incluirse moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Son ligandos de Fc de IgG particulares, los receptores FcRN y Fc-gamma. La expresión "ligando de Fc" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula, preferentemente un polipéptido, procedente de cualquier organismo, que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de Fc/ligando de Fc.

La expresión "receptor de Fc-gamma", "FcγR" o "FcγgammaR" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier elemento de la familia de proteínas que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y se encuentra codificado en un gen de FcγR. En el ser humano, esta familia incluye, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIA, FcγRIB y FcγRIC; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIA (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIB (incluyendo FcγRIIB-1 y FcγRIIB-2), y FcγRIIC; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIA (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIB (incluyendo los alotipos FcγRIIB-NA1 y FcγRIIB-NA2) (Jefferis, et al., Immunol. Lett 82 (2002) 57-65), así como cualesquiera FcγR o isoformas o alotipos de FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Entre los FcγR de ratón se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualesquiera FcγR o isoformas o alotipos de FcγR humanos no descubiertos.

El término "FcRn" o "receptor de Fc neonatal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína que se une a la región Fc de anticuerpo IgG y se encuentra codificada por lo menos en parte por un gen de FcRn. Un FcRn puede ser de cualquier organismo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Tal como es conocido en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, con frecuencia denominados cadena pesada y cadena ligera. La cadena ligera es microglobulina beta-2 y la cadena pesada está codificada por el gen de FcRn. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de cadena pesada de FcRn con microglobulina beta-2.

La expresión "polipéptido de tipo salvaje o parental" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido no modificado que seguidamente se modifica para generar una variante. El polipéptido de tipo salvaje puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión manipulada de un polipéptido natural. Polipéptido de tipo salvaje puede referirse al polipéptido mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido parental o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. De acuerdo con lo anterior, "inmunoglobulina de tipo salvaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y "anticuerpo de tipo salvaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe indicarse que "anticuerpo de tipo salvaje" incluye anticuerpos producidos recombinantemente comerciales conocidos, tal como se indica de manera general posteriormente.

La expresión "polipéptido fragmento cristizable (Fc)" es la parte de una molécula de anticuerpo que interactúa con las moléculas efectoras y las células. Comprende las partes C-terminales de las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

El término "marco" o "RM" se refiere a residuos de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable (RHV). La RM de un dominio variable generalmente consiste de cuatro dominios de RM: RM1, RM2, RM3 y RM4. De acuerdo con lo anterior, las secuencias de RHV y de RM generalmente aparecen en la secuencia siguiente en la VH (o VL): RM1-H1(L1)-RM2-H2(L2)-RM3-H3(L3)-RM4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a un anticuerpo que presenta una estructura sustancialmente similar a la estructura nativa de un anticuerpo o que presenta cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se define en la presente memoria.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Entre las "funciones efectoras" ejemplares se incluyen la unión de C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento, la unión de receptores de Fc, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación negativa de los receptores de superficie celular (p.ej., los receptores de células B, RCB), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (p.ej., un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse utilizando diversos ensayos tal como se da a conocer en la presente memoria, por ejemplo.

La expresión "región bisagra" se define generalmente como un tramo entre Glu216 y Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206, 1985). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la

secuencia de IgG situando el primer y último residuo de cisteína que forman el enlace S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

5 La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C-terminal respecto a la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc.

10 Se define "homología" como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica. Uno de tales programas informáticos es "Align 2", de Genentech Inc., que ha sido presentado con la documentación del usuario en la United States Copyright Office, Washington, D.C. 20559, el 10 de diciembre de 1991.

15 Las expresiones "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan intercambiamente y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Entre las células huésped se incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma con independencia del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos de la misma en una célula parental, sino que puede contener mutaciones. La progenie mutante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección realizado en la célula originalmente transformada se encuentra incluida en la presente memoria.

20 Un "anticuerpo humano" es uno que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humano. Dicha definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

25 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y llevan a cabo una función efectora de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC se incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, en donde resultan preferentes las CMSP y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, p.ej. de sangre o CMSP, tal como se indica en la presente memoria.

30 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoácidos de RHV no humanas y residuos aminoácidos de RM humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las RHV (por ejemplo las RDC) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las RM corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una parte 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 ha sido sometido a humanización.

35 La expresión "región hipervariable", o "RHV", tal como se utiliza en la presente memoria, 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"). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis RHV, tres en la VH (H1, H2 y H3) y tres en la VL (L1, L2 y L3). Las RHV generalmente comprenden residuos aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), presentando éstas últimas una variabilidad de secuencia más alta y/o participando en el reconocimiento de antígeno. Los bucles hipervariables ejemplares se encuentran en los residuos aminoácidos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2), 91 a 96 (L3), 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 102 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Las RDC ejemplares (RDC-L1, RDC-L2, RDC-L3, RDC-H1, RDC-H2 y RDC-H3) se encuentran en los residuos aminoácidos 24 a 34 de L1, 50 a 56 de L2, 89 a 97 de L3, 31 a 35B de H1, 50 a 65 de H2 y 95 a 102 de H3 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Con la excepción de la RDC1 en VH, las RDC generalmente comprenden los residuos aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR comprenden además "residuos determinantes de especificidad" o "RDS", que son residuos que entran en contacto con el antígeno. Los RDS se encuentran contenidas dentro de las regiones de las CDR denominadas abreviadamente RDC, o RDC-a. Las RDC-a ejemplares (RDC-a-L1, RDC-a-L2, RDC-a-L3, RDC-a-H1, RDC-a-H2 y RDC-a-H3) se encuentran en los residuos aminoácidos 31 a 34 de L1, 50 a 55 de L2, 89 a 96 de L3, 31 a 35B de H1, 50 a 58 de H2 y 95 a 102 de H3 (ver Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008). A menos que se indique lo contrario, los residuos de RHV y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo los residuos de RM) se numeran en la presente memoria según Kabat et al., *supra*.

65 La expresión "complejo inmunológico" se refiere a la estructura relativamente estable que se forma al unirse entre sí por lo menos una molécula diana y por lo menos un polipéptido heterólogo que contiene una región Fc, formando un complejo de peso molecular más elevado. Son ejemplos de complejos inmunológicos, los agregados de antígeno-

anticuerpo y los agregados de molécula diana-inmoadhesina. La expresión "complejo inmunológico" tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un complejo *ex vivo* (es decir, diferente de la forma o contexto en el que puede encontrarse naturalmente). Sin embargo, el complejo inmunológico puede administrarse en un mamífero, p.ej. para evaluar el lavado del complejo inmunológico en el mamífero.

5 Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, aunque sin limitación, un agente citotóxico.

10 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, animales domesticados (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 y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

15 Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su medio natural. En algunas realizaciones, se purifica un anticuerpo hasta una pureza superior a 95% o 99% según se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (EIE), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos ver, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87, 2007.

20 Un polipéptido "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido o anticuerpo, y entre ellos pueden incluirse enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido se purifica (1) a más de 95% en peso de polipéptido según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferentemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido in situ dentro de células recombinantes, ya que no se encontrará presente por lo menos un componente del medio natural del polipéptido. Sin embargo, habitualmente el polipéptido aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

35 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que ha sido separada de un componente de su medio natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácidos nucleicos contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácidos nucleicos pero la molécula de ácidos nucleicos se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

40 La expresión "ácido nucleico aislado codificante de un anticuerpo" se refiere a una o más moléculas de ácidos nucleicos codificantes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de los mismos), incluyendo una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos en un único vector o en vectores separados, y una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más localizaciones en una célula huésped.

45 El término "marcaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El marcaje mismo puede ser detectable (por ejemplo marcajes radioisotópicos o marcajes fluorescentes) o, en el caso de un marcaje enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o composición que es detectable.

50 La expresión "dominio de unión a ligando" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier receptor de superficie celular nativo o cualquier región o derivado de la misma que conserva por lo menos una capacidad cualitativa de unión a ligando de un receptor nativo correspondiente. En una realización específica, el receptor es de un polipéptido de superficie celular con un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la superfamilia génica de inmunoglobulinas. Otros receptores que no son miembros de la superfamilia génica de inmunoglobulinas pero que, no obstante, se encuentran específicamente cubiertos por esta definición, son receptores de citoquinas y en particular receptores con actividad de tirosina quinasa (receptores de tirosina quinasa), miembros de las superfamilias de la hematopoyetina y del receptor del factor de crecimiento nervioso y moléculas de adhesión celular, p.ej., las selectinas E, L y P.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo que contienen mutaciones naturales o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, encontrarse presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales

que deben utilizarse según la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, el método del hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de expresión fágica y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, estando descritas en la presente memoria dichos métodos y otros métodos ejemplares para la preparación de anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no se encuentra conjugado con una fracción heteróloga (por ejemplo una fracción citotóxica) o marcaje radioactivo. El anticuerpo desnudo puede encontrarse presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena pesada presenta una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o un dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede ser de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constante y variable.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc observada en la naturaleza. Entre las regiones Fc humanas de secuencia nativa se incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa, región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de las mismas.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, a que son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conector según la práctica convencional.

La expresión "impreso en el envase" se utiliza para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

El término "posición" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente o según un formato establecido, por ejemplo el índice EU de numeración de los anticuerpos.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan intercambiamente para referirse a un polímero de residuos aminoácidos, que comprende residuos aminoácidos naturales o no naturales y no se encuentran limitados a una longitud mínima.

De esta manera, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares se encuentran incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas se encuentran comprendidos en la definición. Los términos incluyen además modificaciones post-traduccionales del polipéptido, incluyendo, por ejemplo, la glucosilación, la sialilación, la acetilación y la fosforilación.

Además, un "polipéptido" en la presente memoria se refiere además a una proteína modificada, tal como deleciones, adiciones y sustituciones individuales o múltiples de aminoácidos en la secuencia nativa, con la condición de que la proteína mantenga una actividad deseada. Por ejemplo, un residuo de serina puede sustituirse para eliminar una única cisteína reactiva o para eliminar los puentes disulfuro o puede llevarse a cabo una sustitución de aminoácido conservadora para eliminar un sitio de corte. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como mediante mutagénesis dirigida a sitio, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La expresión "polipéptido de tipo salvaje" y "región Fc de tipo salvaje (humana)" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido y región Fc, respectivamente, que comprende una secuencia de aminoácidos que

no presenta una o más de las modificaciones de la región Fc dadas a conocer en la presente memoria, debido a que no han sido introducidas, y sirven, por ejemplo, como controles. El polipéptido de tipo salvaje puede comprender una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con modificaciones preexistentes de la secuencia de aminoácidos (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones).

5 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma resulte efectiva, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

10 Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

15 Un polipéptido con afinidad de unión a FcR "alterada" o actividad ADCC es uno que presenta una actividad de unión a FcR y/o actividad ADCC potenciada o reducida en comparación con un polipéptido parental o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La variante de polipéptido que "muestra una unión incrementada" a un FcR se une a por lo menos un FcR con mejor afinidad que el polipéptido parental. El polipéptido variante que "muestra una unión reducida" a un FcR se une a por lo menos un FcR con peor afinidad que el polipéptido parental. Tales variantes que muestran una unión reducida a un FcR pueden presentar poca o ninguna unión a un FcR, p.ej. una unión de 0% a 20% a FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa, p.ej. tal como se determina en los Ejemplos, en la presente memoria.

20 El polipéptido que se une a un FcR con "afinidad reducida" en comparación con un polipéptido parental, es uno que se une a uno o más cualesquiera de los FcR identificados anteriormente con una afinidad de unión sustancialmente reducida en comparación con el anticuerpo parental, en el caso de que las cantidades de polipéptido variante y polipéptido parental en el ensayo de unión sean esencialmente iguales. Por ejemplo, el polipéptido variante con afinidad de unión a FcR reducida puede mostrar aproximadamente 1,15 a aproximadamente 100 veces, p.ej. aproximadamente 1,5 a aproximadamente 50 veces menor afinidad de unión a FcR que el polipéptido parental, en donde la afinidad de unión a FcR se determina, por ejemplo, tal como se da a conocer en los Ejemplos en la presente memoria.

25 El polipéptido que comprende una Fc variante que "media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas menos eficazmente" que un polipéptido parental o de tipo salvaje es uno que in vitro o in vivo resulta sustancialmente menos eficaz en la mediación de la ADCC, en el caso de que las cantidades de polipéptido variante y anticuerpo parental utilizadas en el ensayo sean esencialmente iguales. Generalmente, dichas variantes se identifican utilizando el ensayo in vitro de ADCC tal como se da a conocer en la presente memoria, aunque otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, p.ej. en un modelo animal, etc., se encuentran contemplados. La variante preferente es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 100 veces, p.ej. de aproximadamente dos a aproximadamente cincuenta veces menos eficaz en la mediación de la ADCC que el parental, p.ej. en el ensayo in vitro dado a conocer en la presente memoria.

35 Un "receptor" es un polipéptido capaz de unirse a por lo menos un ligando. El receptor preferente es un receptor de superficie celular con un dominio de unión a ligando extracelular y, opcionalmente, otros dominios (p.ej., el dominio transmembranal, el dominio intracelular y/o el anclaje membranar). El receptor que debe evaluarse en el ensayo indicado en la presente memoria puede ser un receptor intacto o un fragmento o derivado del mismo (p.ej., una proteína de fusión que comprende el dominio de unión del receptor fusionado con uno o más polipéptidos heterólogos). Además, el receptor que debe evaluarse para sus propiedades de unión puede encontrarse presente en una célula o aislarse y opcionalmente utilizarse para recubrir una placa de ensayo o alguna otra fase sólida.

40 La expresión "dominio de unión a receptor" se utiliza para referirse a cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo moléculas de adhesión celular o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que retiene por lo menos una capacidad cualitativa de unión a receptor de un ligando nativo correspondiente. Esta definición incluye específicamente, entre otras, secuencias de unión de ligandos para los receptores anteriormente mencionados.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refieren a la intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer el avance de la misma.

50 La expresión "proteína variante" o "variante de proteína" o "variante" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una proteína que difiere de la de una proteína parental en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido. La proteína variante puede referirse a la proteína misma, a composiciones que comprenden la proteína o

a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Preferentemente, la proteína variante presenta por lo menos una modificación de aminoácido en comparación con la proteína parental, p.ej. de aproximadamente una a aproximadamente setenta modificaciones de aminoácido, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácido en comparación con el parental. La secuencia de la proteína variante en la presente memoria preferentemente posee una homología de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la secuencia de la proteína parental, y lo más preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente 90%, más preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente 95%. La proteína variante puede referirse a la proteína variante misma, a composiciones que comprenden la proteína variante o a la secuencia de ADN que lo codifica. De acuerdo con lo anterior, la "variante de anticuerpo" o el "anticuerpo variante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que difiere del anticuerpo parental en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, "variante de IgG" o "IgG variante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que difiere de una IgG parental en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante" ta como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina parental en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (RM) conservadas y tres regiones hipervariables (RHV) (Ver, p.ej., Kindt et al., Kuby Immunology, 6a ed., W.H. Freeman and Co. (2007), página 91). Puede resultar suficiente un único dominio VH o VL para proporcionar especificidad de unión de antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno con el fin de cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, p.ej., Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887, 1993; Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de propagar otro ácido nucleico al que se encuentra unido. El término incluye el vector en forma de estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión".

La presente solicitud se refiere a polipéptidos que incluyen modificaciones de aminoácidos que modulan la unión a receptores de Fc, en particular a receptores de Fcγ.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones. Otros aspectos de la descripción son informativos. La invención en la presente memoria se refiere a un método para preparar un polipéptido que comprende una Fc variante. El polipéptido "parental", "inicial", "no variante" o de tipo salvaje se prepara utilizando técnicas disponibles para generar polipéptidos o anticuerpos que comprenden una región Fc. En la realización preferente de la invención, el anticuerpo parental es un anticuerpo y se describen en mayor detalle métodos ejemplares para generar anticuerpos en las secciones posteriores. El polipéptido parental puede ser, sin embargo, cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc, p.ej. una inmunoadhesina. Los métodos para generar inmunoadhesinas se elaboran en mayor detalle posteriormente en la presente memoria.

En una realización alternativa, puede generarse una región Fc variante (Fc variante) según los métodos dados a conocer en la presente memoria y esta Fc variante puede fusionarse con un polipéptido heterólogo de elección, tal como un dominio variable de anticuerpo o dominio de unión de un receptor o ligando.

El polipéptido de tipo salvaje comprende una región Fc. Generalmente, la región Fc del polipéptido de tipo salvaje comprende una región Fc de secuencia nativa o de tipo salvaje, y preferentemente una región Fc de secuencia nativa humana (región Fc humana). Sin embargo, la región Fc del polipéptido de tipo salvaje puede presentar una o más alteraciones o modificaciones preexistentes de la secuencia de aminoácidos respecto a una región Fc de secuencia nativa. Por ejemplo, la actividad de unión a C1q o a Fcγ puede haber sido alterada previamente (otros tipos de modificación de región Fc se describen en mayor detalle posteriormente). En una realización adicional, la región Fc de polipéptido parental es "conceptual" y, aunque no existe físicamente, el profesional que manipula los anticuerpos puede decidirse por una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante deseada y generar un polipéptido que comprende dicha secuencia o un ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante deseada.

Sin embargo, en la realización preferente de la invención, un ácido nucleico codificante de una región Fc de un polipéptido de tipo salvaje se encuentra disponible y esta secuencia de ácidos nucleicos se altera para generar una secuencia de ácidos nucleicos variante codificante de la región Fc variante.

El ADN codificante de una variante de secuencia de aminoácidos del polipéptido inicial se prepara mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la

preparación mediante mutagénesis dirigida a sitio (o mediada por oligonucleótidos), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de un ADN preparado anteriormente codificante del polipéptido.

La mutagénesis dirigida a sitio es un método preferente para preparar las variantes por sustitución. Esta técnica es bien conocida de la técnica (ver, p.ej., Carter et al., *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443, 1985, y Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985. Brevemente, al llevar a cabo la mutagénesis dirigida a sitio del ADN, se altera el ADN inicial hibridando en primer lugar un oligonucleótido codificante de la mutación deseada con una cadena individual de dicho ADN inicial. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena completa, utilizando el oligonucleótido hibridado como cebador y utilizando la cadena individual del ADN inicial como molde. De esta manera, el oligonucleótido codificante de la mutación deseada se incorpora en el ADN de doble cadena resultante.

La mutagénesis por PCR también resulta adecuada para generar variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido inicial. Ver Higuchi, en: "PCR Protocols", Academic Press, páginas 177 a 183, 1990, y Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17:723-733, 1989. Brevemente, en el caso de que se utilicen cantidades pequeñas de ADN molde como material de partida en una PCR, pueden utilizarse cebadores que difieren ligeramente en la secuencia respecto a la región correspondiente en el ADN molde para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde únicamente en las posiciones en que los cebadores difieren del molde.

Otro método para preparar variantes, la mutagénesis por inserción de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., *Gene* 34:315-323, 1985.

Una realización comprende polipéptidos que comprenden una región Fc de un anticuerpo, que comprende la adición, sustitución o delección de por lo menos un residuo aminoácido en la región Fc que resulta en una afinidad reducida o anulada para por lo menos un receptor de Fc. La región Fc interactúa con varios receptores o ligandos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, receptores de Fc (p.ej., FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIIA), la proteína del complemento C1q y otras moléculas, tales como las proteínas A y G. Estas interacciones resultan esenciales para una diversidad de funciones efectoras y sucesos de señalización posteriores, incluyendo, aunque sin limitación, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De acuerdo con lo anterior, en determinadas realizaciones, las variantes de la invención presentan una afinidad reducida o anulada para un receptor de Fc responsable de una función efectora en comparación con un polipéptido que presenta la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención pero que no comprende la adición, sustitución o delección de por lo menos un residuo aminoácido a la región Fc (también denominado en la presente memoria "polipéptido de tipo salvaje"). En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención comprende por lo menos una o más de las propiedades siguientes: función efectora reducida o anulada (ADCC y/o CDC y/o ADCP), una unión reducida o anulada a receptores de Fc, una unión reducida o anulada a C1q o toxicidades reducidas o anuladas. Más específicamente, las realizaciones de la invención proporcionan anticuerpos anti-CD20 (equivalente a GA101 o GA), anti-CD9 (equivalente a TA) y anti-selectina (pSel) con afinidad reducida para receptores de Fc (p.ej., FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA) y/o la proteína del complemento C1q.

En una realización, los anticuerpos comprenden una región Fc que comprende por lo menos una adición, sustitución o delección de un residuo aminoácido en la posición P329, en el que el sistema de numeración de la región constante es el del índice EU tal como se indica en Kabat et al., NIH Publication 91:3242, 1991, National Technical Information Service, Springfield, VA.

En una realización específica, los polipéptidos comprenden una Fc variante de un polipéptido Fc humano de tipo salvaje, donde dicha variante comprende una sustitución de aminoácido en la posición Pro329, en el que la numeración de los residuos en la región Fc de IgG es la del índice EU según Kabat. En todavía otra realización, dicha variante comprende por lo menos una sustitución de aminoácido adicional.

En todavía otra realización, el polipéptido que comprende una Fc variante de un polipéptido Fc humano de tipo salvaje presenta una sustitución, delección o adición de aminoácido que destruye o reduce la función del sándwich de prolina en la región y/o interfaz del polipéptido Fc con el receptor de Fc gamma.

En otra realización, se sustituye Pro329 por un aminoácido que es más pequeño o más grande que la prolina. En todavía otra realización, el aminoácido sustituido es Gly, Ala o Arg. En la invención, Pro329 del polipéptido Fc se sustituye por glicina.

En todavía otra realización, dicho polipéptido que comprende una Fc variante presenta por lo menos una sustitución, adición o delección de aminoácido adicional. En todavía otra realización, dicha variante muestra una afinidad reducida para un receptor de Fc humano (FcγR) y/o un receptor del complemento humano en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

En otra realización, dicho polipéptido que comprende una Fc variante muestra una afinidad reducida para un receptor de Fc humano (FcγR) y/o un receptor del complemento humano en comparación con el polipéptido que la región Fc

humana de tipo salvaje. En una realización adicional, la afinidad para por lo menos uno de FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIIA es reducida; en una realización todavía adicional, la afinidad para FcγRI y FcγRIIIA es reducida, y en una realización todavía adicional, la afinidad para FcγRI y FcγRIIIA es reducida; en un aspecto todavía adicional de la invención, la afinidad para el receptor de FcγRI, el receptor de FcγRIIIA y C1q es reducida, y en un aspecto todavía adicional de la invención, la afinidad para FcγRI, FcγRII, FcγRIIIA y el receptor de C1q es reducida.

En una realización todavía adicional, la ADCC inducida por dicho polipéptido que comprende una Fc variante es reducida, y en una realización preferente, la ADCC resulta reducida a por lo menos 20% de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje. En un aspecto todavía adicional de la invención, la ADCC y la CDC inducidas por el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje se encuentra reducida o anulada y en un aspecto todavía adicional, el polipéptido que comprende una Fc variante indicada anteriormente muestra una ADCC, CDC y ADCP reducidas en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

En una realización, la sustitución o sustituciones de aminoácido adicionales en el polipéptido que comprende la Fc variante se seleccionan del grupo: S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En la invención, se encuentran incluidas las sustituciones L234A y L235A.

En un aspecto determinado de la invención, el polipéptido que comprende una Fc variante comprende un anticuerpo. En todavía otro aspecto de la invención, el polipéptido que comprende una Fc variante comprende una región Fc de IgG1 humana. En un aspecto todavía adicional, las variantes son anticuerpos IgG1.

En otra realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante Pro329 comprenden además por lo menos una adición, sustitución o delección de un residuo aminoácido en la región Fc que se correlaciona con una estabilidad incrementada del anticuerpo. En un aspecto todavía adicional de la invención, la afinidad del polipéptido que comprende una Fc variante indicada anteriormente para el receptor de FcγR está sólo ligeramente, y por ejemplo no más de 10-20% de la afinidad del polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje alterada.

En una realización, la adición, sustitución o delección de un residuo aminoácido en un polipéptido que comprende una Fc variante se encuentra en la posición 228 y/o 235 de la región Fc, en la que el sistema de numeración de la región constante es la del índice EU según Kabat et al.

En una realización específica, la serina en la posición 228 y/o la leucina en la posición 235 en dicho polipéptido que comprende una Fc variante se sustituye por otro aminoácido.

En una realización específica, los polipéptidos que comprende una Fc variante comprenden una región Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 228, en la que el residuo serina se sustituye por prolina.

En una realización específica, los polipéptidos que comprende una Fc variante comprenden una región Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 235, en la que el residuo leucina se sustituye por ácido glutámico.

En una realización específica, el polipéptido que comprende una Fc variante comprende una triple mutación: una sustitución de aminoácido en la posición P329, una mutación S228P y una mutación L235E (P329 / SPLE).

En una realización, la adición, sustitución o delección de un residuo aminoácido se encuentra en la posición 234 y/o 235 de la región Fc, en la que el sistema de numeración de la región constante es la del índice EU según Kabat et al.

El polipéptido que comprende una Fc variante comprende un polipéptido Fc humano de tipo salvaje comprende una triple mutación: una sustitución de aminoácido en la posición Pro329, una mutación L234A y una mutación L235A (P329 / LALA).

Los polipéptidos anteriormente indicados comprenden una región de IgG1 humana.

Aunque resulta preferente alterar la unión a un FcγR, las variantes de la región Fc con afinidad de unión alterada para el receptor neonatal (FcRn) también se encuentran contempladas en la presente memoria. Las variantes de la región Fc con afinidad mejorada para FcRn se prevé que presenten semividas en suero más prolongadas y tales moléculas presentarán aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en los que se desee una semivida prolongada del polipéptido administrado, p.ej. para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Por el contrario, las variantes de la región Fc con una afinidad de unión a FcRn reducida se espera que presenten semividas más cortas y tales moléculas pueden administrarse, por ejemplo, en un mamífero en el caso de que un tiempo de circulación acortado resulte ventajoso, p.ej. para la obtención de imágenes diagnósticas in vivo o para polipéptidos que presentan efectos secundarios tóxicos al dejarlos en circulación en el torrente sanguíneo durante periodos prolongados, etc. Las variantes de la región Fc con una afinidad de unión a FcRn reducida se prevé que resulte menos probable que crucen la placenta y, de esta manera, podrían utilizarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres gestantes.

65

Las variantes de región Fc con afinidad de unión alterada para FcRn incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una o más posiciones aminoácidas cualesquiera de entre: 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 o 447. Aquellas que muestran una unión reducida a FcRn generalmente comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una o más posiciones aminoácidas cualesquiera de entre: 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447; y aquellas con una unión incrementada a FcRn habitualmente comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una o más cualesquiera de las posiciones aminoácidas 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434.

Unión reducida a ligandos de Fc

El experto en la materia entenderá que los anticuerpos de la invención pueden presentar propiedades de unión de FcγR y/o C1q alteradas (respecto a un anticuerpo no modificado) (entre los ejemplos de propiedades de unión se incluyen, aunque sin limitación, la especificidad de unión, la constante de equilibrio de disociación (K_D), las tasas de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente), la afinidad de unión y/o la avidéz) y que determinadas alteraciones resultan más o menos deseables. Es conocido de la técnica que la constante de equilibrio de disociación (K_D) se define como k_{off}/k_{on} . El experto en la materia puede determinar qué parámetro cinético resulta más importante para una aplicación de anticuerpo dada. Por ejemplo, una modificación que reduzca la unión a uno o más reguladores positivos (p.ej., FcγRIIIA) y/o una unión mejorada a un receptor de Fc inhibidor (p.ej., FcγRIIb) resultaría adecuada para reducir la actividad de ADCC. De acuerdo con ello, la proporción de afinidades de unión (p.ej., constantes de equilibrio de disociación (K_D)) puede indicar si la actividad ADCC de un anticuerpo de la invención se encuentra incrementada o reducida. Además, una modificación que reduce la unión a C1q resultaría adecuada para reducir o eliminar la actividad de CDC. Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc para su ligando pueden determinarse mediante una diversidad de métodos de ensayo in vitro (ensayos de base bioquímica o inmunológica) conocidos de la técnica para determinar las interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR, incluyendo, aunque sin limitación, los métodos de equilibrio (p.ej., un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinéticos (p.ej., el análisis de BIACORE®) y otros métodos, tales como los ensayos de unión indirecta, los ensayos de inhibición competitiva, la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés), la electroforesis en gel y la cromatografía (p.ej., la filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcaje en uno o más de los componentes a examen y/o utilizar una diversidad de métodos de detección, incluyendo, aunque sin limitación, marcajes cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Puede encontrarse una descripción detallada de las afinidades y cinéticas de unión en Paul W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4a ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.

En un aspecto de la invención, un polipéptido que comprende una Fc variante de una región Fc humana de tipo salvaje, según se reivindica, muestra una afinidad reducida para un receptor de Fc humano (FcγR) y/o un receptor del complemento humano en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje. En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para un receptor de Fc que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores que para un polipéptido Fc de tipo salvaje.

En un aspecto, los polipéptidos que comprende una Fc variante de la invención muestran una afinidad de unión reducida para uno o más receptores de Fc, incluyendo, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIA, FcγRII y FcγRIII (CD16, incluyendo las isoformas de FcγRIIIA) en comparación con un anticuerpo no modificado.

En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una afinidad de unión reducida para FcγRI (CD64), FcγRIIA y FcγRIIIA en comparación con un anticuerpo no modificado.

En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una afinidad de unión reducida para FcγRIIA y FcγRIIIA en comparación con un anticuerpo no modificado.

En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una afinidad de unión reducida para FcγRI (CD64) y FcγRIIIA en comparación con un anticuerpo no modificado.

En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención que muestran una afinidad de unión reducida para los receptores de Fc también muestran una afinidad reducida para el receptor de C1q.

En determinado aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención no comprenden un incremento concomitante de la unión al receptor de FcγRIIB en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En determinados aspectos de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante presentan una afinidad reducida para el receptor humano FcγIIIA y para por lo menos un receptor adicional del grupo que comprende los receptores humanos FcγIIA, FcγIIIB y C1q en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo

- 5 salvaje. En aspectos adicionales de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante presentan una afinidad reducida para el receptor humano FcγIIIA y para por lo menos dos receptores adicionales del grupo que comprende los receptores humanos FcγIIA, FcγIIIB y C1q en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje. En un aspecto adicional de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante presentan una afinidad reducida para FcγRIA, FcγIIIA, FcγIIA, FcγIIIB y C1q humanos en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje. En todavía otro aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante presentan una afinidad reducida para los receptores humanos FcγRIA, FcγIIIA, FcγIIA, FcγIIIB, y C1q en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.
- 10 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades de unión reducidas para FcγRI y FcγRIIA en comparación con un anticuerpo no modificado. En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante muestran afinidades para FcγRI o FcγRIIA que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores que para un polipéptido Fc de tipo salvaje. En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante muestran afinidad para FcγRI o FcγRIIA que es por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 40%, por lo menos 30%, por lo menos 20%, por lo menos 10% o por lo menos 5% inferior a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 15 20 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una afinidad reducida para FcγRIIIA en comparación con un anticuerpo no modificado. En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRIIIA que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 25 30 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRIIIA que son por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 40%, por lo menos 30%, por lo menos 20%, por lo menos 10% o por lo menos 5% inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 35 Se entiende en la técnica que la variante alélica F1-58V de FcγRIIIA presenta características de unión a anticuerpos alteradas. En una realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención se unen a los receptores FcγRIIIA con afinidades reducidas en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRIIIA (F1 58V) que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 40 45 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una afinidad reducida para el receptor de C1q en comparación con un anticuerpo no modificado. En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para el receptor de C1q que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 50 55 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para C1q que son por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 40%, por lo menos 30%, por lo menos 20%, por lo menos 10% o por lo menos 5% inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- 60 65 En un aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRIIIA (F1 58V) o receptores de C1q que son por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 40%, por lo menos 30%, por lo menos 20%, por lo menos 10% o por lo menos 5% inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.
- En otro aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRIIIA (F1 58V) y/o receptores de C1q, respectivamente, que son de aproximadamente 10 nM a 100 nM, de 10 nM a 1 μM, de 100 nM a about 100 μM, o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μM, o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μM, o de aproximadamente 100 μM, o de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM, o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM, o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM. En determinadas

realizaciones, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRIIIA (FI-58V) o receptores de C1q que son superiores a 100 nM, 500 nM, 1 μM, superiores a 5 μM, superiores a 10 μM, superiores a 25 μM, superiores a 50 μM, o superiores a 100 μM.

5 En otro aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades reducidas para FcγRIIB en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para FcγRIIB no modificadas o incrementadas en por lo menos 2 veces, o en por lo menos 3 veces, o en por lo menos 5 veces, o en por lo menos 7 veces, o en por lo menos 10 veces, o en por lo menos 20 veces, o en por lo menos 30 veces, o en por lo menos 40 veces, o en por lo menos 50 veces, o en por lo menos 60 veces, o en por lo menos 70 veces, o en por lo menos 80 veces, o en por lo menos 90 veces, o en por lo menos 100 veces, o en por lo menos 200 veces respecto a la de un polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para el receptor de FcγRIIB que se encuentran incrementadas en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 95% respecto a la de un polipéptido de tipo salvaje.

En otro aspecto de la invención, las variantes de la invención muestran afinidades para FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRIIIA (FI 58V) o receptores de C1q que son inferiores a 100 μM, inferiores a 50 μM, inferiores a 10 μM, inferiores a 5 μM, inferiores a 2,5 μM, inferiores a 1 μM o inferiores a 100 nM, o inferiores a 10 nM.

20 Función efectora reducida

En determinados aspectos de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención modulan una función efectora respecto al polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

25 En todavía otro aspecto de la invención, esta modulación es una modulación de la ADCC y/o ADCP y/o CDC. En un aspecto adicional de la invención, esta modulación es una modulación negativa o reducción del efecto. En todavía otro aspecto de la invención, es una modulación de la ADCC y en todavía otro aspecto de la invención, esta modulación es una modulación negativa de la ADCC. En todavía otro aspecto, esta modulación es una modulación negativa de la ADCC y la CDC; en todavía otra realización, es una modulación negativa de la ADCC únicamente; en todavía otra realización, es una modulación negativa de la ADCC, de la CDC y/o de la ADCP. En todavía otro aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención modulan negativamente o reducen la ADCC/CDC y ADCP.

35 En un aspecto adicional de la invención, la reducción o modulación negativa de la ADCC o CDC o ADCP inducida por el polipéptido que comprende la Fc variante es una reducción a 0, 2,5, 5, 10, 20, 50 o 75% del valor observado para la inducción de la ADCC o CDC o ADCP, respectivamente, por el polipéptido que comprende la región Fc de tipo salvaje.

40 En aspectos todavía adicionales de la invención, la modulación de la ADCC inducida por los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención es una reducción de la potencia, de manera que la EC₅₀ de dicha Fc variante se encuentra reducida en aproximadamente >10 veces respecto al polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

45 En todavía otro aspecto, la variante según la invención no presenta ADCC y/o CDC y/o ADCP sustanciales en presencia de células efectoras humanas en comparación con el polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

50 En todavía otro aspecto de la invención, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una función efectora reducida, por ejemplo una reducción de por lo menos 20%, o fuertemente reducida, por ejemplo una reducción de por lo menos 50%, que podría ser una reducción de la ADCC (modulación negativa), CDC y/o ADCP.

Actividad de ADCC reducida

55 Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o de ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) que garanticen que el anticuerpo no presenta unión a FcγR (por lo tanto, que probablemente no presenta actividad de ADCC), aunque conserva la capacidad de unión a FcγRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, RII y RIII. La expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991. Los ejemplos no limitativos de ensayos in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente US nº 5.500.362 (ver, p.ej., Hellstrom I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986, y Hellstrom I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985; patente nº US 5.821.337 (ver Bruggemann M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987). Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96®, Promega,

Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que por lo tanto no presenta actividad de CDC. Ver, p.ej., el ELISA de unión de C1q y C3c en los documentos n° WO 2006/029879 y n° WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163, 1996; Cragg, M.S., et al., Blood 101:1045-1052, 2003 y Cragg M.S. y Glennie M.J., Blood 103:2738-2743, 2004). La unión de FcRn y las determinaciones de eliminación/semivida in vivo también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. et al., Int. Immunol. 18(12):1759-1769, 2006).

Se encuentra contemplado que los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención se caractericen mediante ensayos funcionales in vitro para determinar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan propiedades de unión y funciones de células efectoras similares en modelos in vivo (tales como las indicadas y dadas a conocer en la presente memoria) a aquellas en ensayos in vitro. Sin embargo, la presente invención no excluye variantes de la invención que no muestran el fenotipo deseado en ensayos in vitro pero que sí muestran el fenotipo deseado in vivo. En una realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran actividades de ADCC reducidas en comparación con polipéptidos Fc de tipo salvaje no modificados. En otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran actividades ADCC que son por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces o por lo menos 100 veces inferiores a la de un anticuerpo no modificado. En todavía otra realización, los anticuerpos de la invención muestran actividades ADCC reducidas en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 100% respecto a un anticuerpo no modificado. En un aspecto adicional de la invención, la reducción o modulación negativa de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende la Fc variante es una reducción a 0, 2,5, 5, 10, 20, 50 o 75% del valor observado para la inducción de la ADCC o ADCP, respectivamente, por el polipéptido que comprende la región Fc de tipo salvaje. En determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención no presentan actividad de ADCC detectable. En realizaciones específicas, la reducción y/o eliminación de la actividad de ADCC puede atribuirse a la afinidad reducida de los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención para ligandos y/o receptores de Fc. En una realización específica de la invención, la modulación negativa de la ADCC es una reducción de la potencia, de manera que la EC₅₀ de dicho polipéptido que comprende una Fc variante es aproximadamente 10 veces o más inferior a la del polipéptido Fc de tipo salvaje.

En todavía otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención modulan la ADCC y/o la CDC y/o la ADCP. En un aspecto específico, las variantes según la invención muestran una actividad de CDC y ADCC y/o de ADCP.

Actividad de CDC reducida

La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula, un anticuerpo por ejemplo, acompañada con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC, tal como se indica en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163, 1996.

Las propiedades de unión de las diferentes variantes a C1q puede analizarse mediante un inmunoensayo ELISA de tipo sándwich. La concentración de anticuerpo a la que se produce una respuesta semimáxima determina el valor de EC₅₀. Este resultado se expresa como diferencia relativa al estándar de referencia medida en la misma placa junto con el coeficiente de variación de la muestra y de la referencia.

En una realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención muestran afinidades para C1q en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En otra realización, de los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención muestran afinidades para el receptor de C1q que son por lo menos 2 veces, o por lo menos 3 veces, o por lo menos 5 veces, o por lo menos 7 veces, o por lo menos 10 veces, o por lo menos 20 veces, o por lo menos 30 veces, o por lo menos 40 veces, o por lo menos 50 veces, o por lo menos 60 veces, o por lo menos 70 veces, o por lo menos 80 veces, o por lo menos 90 veces, o por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje.

En otra realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante según la invención muestran afinidades para C1q que son por lo menos 90%, por lo menos 80%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 40%, por lo menos 30%, por lo menos 20%, por lo menos 10% o por lo menos 5% inferiores a la de un polipéptido de tipo salvaje. En otra realización, las variantes según la invención muestran afinidades para C1q que son de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM, o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μM, o de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μM, o de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM, o de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM,

o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM . En determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran afinidades para C1q que son superiores a 1 μM , superiores a 5 μM , superiores a 10 μM , superiores a 25 μM , superiores a 50 μM , o superiores a 100 μM .

5 En una realización, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra actividades de CDC reducidas en comparación con el polipéptido Fc de tipo salvaje. En otra realización, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra actividades de CDC que son por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces o por lo menos 100 veces inferiores a las de un anticuerpo no modificado. En todavía otra realización, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra actividades de CDC reducidas en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400% o por lo menos 500% respecto al polipéptido de tipo salvaje. En determinados aspectos, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención no presentan actividades de CDC detectables. En realizaciones específicas, la reducción y/o eliminación de la actividad de CDC puede atribuirse a la afinidad reducida de los polipéptidos que comprenden una Fc variante para ligandos y/o receptores de Fc.

Toxicidad relacionada con anticuerpos reducida

20 Se entiende en la técnica que las terapias biológicas pueden presentar problemas de toxicidad asociados a la compleja naturaleza de dirigir el sistema inmunológico para reconocer y atacar las células y/o dianas no deseadas. En el caso de que el reconocimiento y/o la localización para el ataque no tengan lugar en donde se requiere el tratamiento, pueden producirse consecuencias, tales como una toxicidad adversa. Por ejemplo, la tinción con anticuerpos de tejidos no diana puede ser indicativa de potenciales problemas de toxicidad.

25 En un aspecto, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra una tinción reducida de tejidos no diana en comparación con el polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra una tinción reducida de los tejidos no diana que son por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 30 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 60 veces, por lo menos 70 veces, por lo menos 80 veces, por lo menos 90 veces, por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a la de un polipéptido Fc de tipo salvaje. En otra realización, las variantes de la invención muestran una tinción reducida de los tejidos no diana reducida en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400% o por lo menos 500% respecto al polipéptido Fc de tipo salvaje.

35 En una realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una toxicidad relacionada con anticuerpos en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En otra realización, el polipéptido que comprende una Fc variante de la invención muestra toxicidades que son por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 30 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 60 veces, por lo menos 70 veces, por lo menos 80 veces, por lo menos 90 veces, por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferiores a las de un polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran toxicidades reducidas en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400% o por lo menos 500% respecto al polipéptido de tipo salvaje.

Agregación de trombocitos

50 En un aspecto de la invención, el polipéptido de tipo salvaje induce la activación plaquetaria y/o la agregación plaquetaria, y las variantes del mismo, es decir, polipéptidos que comprenden Fc variantes, muestran una activación y/o agregación de trombocitos reducida o incluso anulada. En todavía otro aspecto de la invención, dichos polipéptidos de tipo salvaje son anticuerpos con diana en una proteína plaquetaria. En todavía otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo CD9. En todavía otra realización, este anticuerpo CD9 presenta una mutación en la posición P329G y/o en la posición L234A / L235A o S228P / L235E (P329G/LALA, P329G/SPLE). En una realización específica adicional, el anticuerpo se caracteriza por la SEC ID n° 8-14.

60 Se entiende en la técnica que las terapias biológicas pueden presentar como efecto adverso la agregación de trombocitos. Podrían utilizarse ensayos in vitro e in vivo para medir la agregación de trombocitos. Se supone que el ensayo in vitro refleja la situación in vivo.

65 En un aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos en un ensayo in vitro en comparación con el polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos en un ensayo in vitro que es por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 7 veces,

por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 30 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 60 veces, por lo menos 70 veces, por lo menos 80 veces, por lo menos 90 veces, por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferior a la de un polipéptido de tipo salvaje. En otra realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos en un ensayo in vitro reducido en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400% o por lo menos 500% respecto al polipéptido de tipo salvaje.

En todavía otro aspecto, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos in vivo en comparación con un polipéptido de tipo salvaje. En otro aspecto, las variantes de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos en un ensayo in vivo, que es por lo menos 2 veces, por lo menos 3 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 30 veces, por lo menos 40 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 60 veces, por lo menos 70 veces, por lo menos 80 veces, por lo menos 90 veces, por lo menos 100 veces, o por lo menos 200 veces inferior a la de un polipéptido Fc de tipo salvaje. En otra realización, los polipéptidos que comprenden una Fc variante de la invención muestran una agregación reducida de los trombocitos en un ensayo in vivo reducida en por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 300%, por lo menos 400% o por lo menos 500% respecto al polipéptido de tipo salvaje.

Internalización de anticuerpos

Variantes de la invención pueden unirse a antígenos de superficie celular que pueden internalizarse, transportando adicionalmente los anticuerpos al interior de la célula. Una vez en el interior de la célula, las variantes pueden liberarse al citoplasma, con diana en un compartimiento específico o se reciclaron a la superficie celular. En algunas realizaciones, las variantes de la invención se unen a un antígeno de superficie celular que internaliza. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden dirigirse a orgánulos o compartimientos específicos de la célula. En todavía otras realizaciones, las variantes de la invención pueden reciclarse a la superficie celular o a la periferia después de la internalización.

En una realización específica, el anticuerpo de la invención es específico para la selectina-p, CD9, CD19, CD81, CCR5 o CXCR5, IL17a o IL-33.

Preparación de anticuerpos

En la realización preferente de la invención, el polipéptido que contiene una región Fc que se modifica según las enseñanzas en la presente memoria es un anticuerpo. A continuación, se proporciona técnicas para producir anticuerpos:

Selección y preparación de antígenos

En el caso de que el polipéptido sea un anticuerpo, se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo en un mamífero que sufre de una enfermedad o trastorno puede resultar en un beneficio terapéutico en dicho mamífero. Sin embargo, también se encuentran contemplados anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolípido asociados a tumor; ver la patente US n° 5.091.178).

En el caso de que el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranal (p.ej., un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Entre los antígenos ejemplares se incluyen moléculas tales como la renina, una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina, factor liberador de hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, hormona estimulante del tiroides, lipoproteínas, alfa-1-antitripsina, cadena A de la insulina, cadena B de la insulina, proinsulina, hormona folículo-estimulante, calcitonina, hormona luteinizante, glucagón, factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular (FT) y el factor de von Willebrand; factores anticoagulación, tales como la proteína C; factor natriurético auricular, tensoactivo pulmonar, un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), bombesina, trombina, factor de crecimiento hematopoyético, factor alfa y beta de necrosis tumoral, encefalinas, RANTES (por sus siglas en inglés, regulada con la activación normalmente expresada y secretada por células T), proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica, tal como la albúmina sérica humana; sustancia inhibidora mulleriana, cadena A de la relaxina, cadena B de la relaxina, prorrelaxina, péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA, por sus siglas en inglés), tal como CTLA-4; inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés); receptores de hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF, por sus siglas en inglés), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés); factor de crecimiento fibroblástico, tal como aFGF y bFGF; factor e crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés);

factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a insulina-I y -II (por sus siglas en inglés, IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión de unión a factor de crecimiento similar a insulina; proteínas CD, tales como CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogénica ósea (BMP, por sus siglas en inglés); un interferón, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF, por sus siglas en inglés), p.ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (IL), p.ej., IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; proteínas membranales de superficie; factor acelerador de la degradación; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una parte de la cubierta del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de localización; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como un receptor HER2, HER3 o HER4 y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente indicados.

Entre las dianas moleculares preferentes para los anticuerpos comprendidos en la presente invención se incluyen proteínas CD tales como CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores de ErbB, tales como el receptor de EGF, HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina α 4/ β 7 e integrina α v/ β 3, incluyendo las subunidades α o β de los mismos (p.ej., los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF, factor tisular (TF), interferón alfa (α -IFN); una interleuquina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; proteína CTLA-4; proteína C, etc.

Pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos, antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas. Para las moléculas transmembranales, tales como receptores, pueden utilizarse como el inmunógeno fragmentos de los mismos (por ejemplo el dominio extracelular de un receptor). Alternativamente, pueden utilizarse como el inmunógeno células que expresan la molécula transmembranal. Dichas células pueden obtenerse de una fuente natural (por ejemplo líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que han sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranal. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferentemente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en las especies que deben inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa americana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación mediante los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante los residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o carbodiimida, donde R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante combinación con, por ejemplo, 100 mg ó 5 μ g de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales recibieron un refuerzo de aproximadamente 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en coadyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, se extraen muestras de sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para el título de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta que el título alcanza un nivel estable. Preferentemente el animal recibe un refuerzo de conjugado del mismo antígeno, aunque conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de entrecruzamiento diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante en forma de proteínas de fusión. También pueden utilizarse convenientemente agentes agregantes tales como alúmina para intensificar la respuesta inmunológica.

Anticuerpos monoclonales

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256:495, 1975, o mediante cualquier método de ADN recombinante (patente US nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, tal como se ha indicado anteriormente para inducir los linfocitos que producen o que son capaces de producir los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. A continuación, los linfocitos se fusionaron con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), páginas 59 a 103).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se sembraron y cultivaron en un medio de cultivo adecuado que contenía preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, en el caso de que las células de mieloma parental no presenten el enzima hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente

incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), en el que las sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

5 Las células de mieloma preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, dan soporte a una producción estable de nivel elevado de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y/o son sensibles a un medio tal como medio HAT. De entre ellas, las líneas celulares de mieloma preferentes son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, y SP-2 y las células X63-Ag8-653, disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos ya han sido descritas (Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, páginas 51 a 63).

15 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma crecen puede someterse a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA).

20 Tras identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y se cultivan mediante métodos estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), páginas 59 a 103). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo en forma de tumores ascites en un animal.

25 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, líquido ascites o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

30 El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que sean capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma pueden servir como fuente preferente de dicho ADN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían proteínas inmunoglobulinas, con el fin de conseguir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describe en mayor detalle posteriormente.

40 En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty J. et al., Nature 348:552-554, 1990. Clackson, et al., Nature 352:624-628, 1991 y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991, describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas fágicas. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology 10:779-783, 1992), así como la infección combinatorial y la recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas fágicas de gran tamaño (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266, 1993). De esta manera, dichas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

50 El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante por dominios constante de cadena pesada y cadena ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US Nº 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984), o mediante la unión covalente de la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina.

55 Típicamente, tales polipéptidos no inmunoglobulina pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno con especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno con especificidad para un antígeno diferente.

60 Afinidad de anticuerpos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria presenta una constante de disociación (Kd) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo de 10^{-8} M o inferior, por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} M , por ejemplo de entre 10^{-9} M y 10^{-13} M).

65 En una realización, Kd se mide mediante un antígeno marcado radioactivamente o un ensayo de unión de receptores

de Fc (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se indica en el ensayo siguiente. La afinidad de unión en solución de los Fab para el antígeno mediante el equilibrado de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ^{125}I en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, capturando seguidamente el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999). Para establecer condiciones para el ensayo, se recubrieron placas multipocillo MICROTITER® (ThermoScientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc n° 269620), se mezclaron antígeno- ^{125}I 100 o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599, 1997). A continuación, se incubó el Fab de interés durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más prolongado (por ejemplo aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio.

A continuación, se transfirieron las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo durante una hora). A continuación, se retiró la solución y la placa se lavó ocho veces con polisorbato-20 al 0,1% (Tween-20®) en PBS. Tras secarse las placas, se añadieron 150 µl/pocillo de líquido de centelleo (Microscint-20™, Packard) y las placas se contaron en un contador gamma Topcount™ (Packard) durante diez minutos. Para la utilización en ensayos de unión competitiva se seleccionaron concentraciones de cada Fab que proporcionaban una unión máxima inferior o igual a 20%.

Según otra realización, se midió la Kd mediante ensayos de resonancia del plasmón superficial utilizando un BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con antígeno inmovilizado o chips CM5 con receptor de Fc a razón de ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se diluyó el antígeno con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con polisorbato-20 al 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/minuto. Las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (software de evaluación BIACORE®, versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de equilibrio de disociación (Kd) se calcula como la proporción $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Ver, p.ej., Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999. En el caso de que la tasa 'on' exceda $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ según el ensayo de resonancia de plasmón superficial indicado anteriormente, la tasa 'on' puede determinarse mediante la utilización de una técnica de inhibición de fluorescencia que mide el incremento o reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación a 295 nm, emisión a 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de un sistema de interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un fragmento de anticuerpo. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos indicados posteriormente. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, p.ej., Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), páginas 269 a 315, 1994; ver también el documento n° WO 93/16185 y las patentes US n° US 5.571.894 y n° US 5.587.458. Para un comentario de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprende residuos de epítipo ligante de receptor de reciclaje y que presentan una semivida incrementada, ver la patente US n° 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, la patente n° EP 0 404 097, el documento n° WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003, y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis Inc., Waltham M.A.; ver, por ejemplo, la patente US n° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fagos), tal como se indica en la presente memoria.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen en, p.ej., la patente nº US 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984. 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 un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase intercambiada" en el que la clase o subclase ha sido modificada respecto a la del anticuerpo parental. Entre los anticuerpos quiméricos se incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad para el ser humano, reteniendo simultáneamente la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las RHV, por ejemplo las RDC (o partes de las mismas) se obtienen de un anticuerpo no humano, y las RM (o partes de las mismas) se obtienen de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente comprende además por lo menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de RM en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo el anticuerpo del que se derivan los residuos de RHV), por ejemplo para restaurar o mejorar la especificidad o la afinidad del anticuerpo.

Se proporciona una revisión de los anticuerpos humanizados y métodos de preparación de los mismos en, p.ej., Almagro y Francon, Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008, y se describen adicionalmente en, p.ej., Riechmann et al., Nature 332:323-329, 1988; Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989; patentes US nº 5.821.337, nº 7.527.791, nº 6.982.321 y nº 7.087.409; Kashmiri, et al., Methods 36:25-34, 2005 (que describe la injertación de RDS (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498, 1991 (que describe la "remodelación de la superficie"); Dall'Acqua, et al., Methods 36:43-60, 2005 (que describe el "intercambio de RM") y Osbourn, et al., Methods 36:61-68, 2005 y Klimka, et al., Br. J. Cancer 83:252-260, 2000 (que describe el enfoque de "selección guiada" al intercambio de RM).

Entre las regiones de marco humanas que pueden utilizarse para la humanización se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las regiones marco seleccionadas utilizando el método "de ajuste óptimo" (ver, p.ej., Sims et al., J. Immunol. 151:2296, 1993), las regiones de marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (ver, p.ej., Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992, y Presta et al., J. Immunol. 151:2623, 1993), regiones de marco maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones de marco de línea germinal humanas (ver, p.ej., Almagroy Fransson, Front. Biosci. 272:1619-1633, 2008) y regiones de marco derivadas del cribado de bibliotecas de RM (ver, p.ej., Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684, 1997 y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618, 1996).

Anticuerpos humanos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo humano. Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas de la técnica. Los anticuerpos humanos se describen de manera general en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74, 2001, y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459, 2008.

Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la administración de un inmunógeno en un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos inactivos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al reto antigénico. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una parte de los loci de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los loci de inmunoglobulina endógenos, o que se encuentran presentes extracromosómicamente o se integran aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógenos han sido generalmente inactivados. Para una revisión de los métodos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, ver Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125, 2005. Ver también, p.ej., las patentes nº US 6.075.181 y nº US 6.150.584, que describen la tecnología Xenomouse™; la patente nº US 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®, la patente nº US 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la solicitud publicada de patente nº US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Pueden modificarse adicionalmente regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales, por ejemplo mediante la combinación con una región constante humana diferente.

También pueden prepararse anticuerpos humanos mediante métodos basados en hibridomas. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos ya han sido descritas (ver, p.ej., Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, páginas 51 a 63, y Boerner et al., J. Immunol. 147:86, 1991). También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562, 2006. Entre los métodos adicionales se incluyen los indicados en, por ejemplo, la patente nº US 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue 26(4):265-268, 2006 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) también se describe en Vollmers y

Brandlein, *Histology and Histopathology* 20(3):927-937, 2005, y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-191, 2005.

También pueden generarse anticuerpos humanos mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clon de Fv a partir de bibliotecas de expresión fágica de origen humano. Dichas secuencias de dominio variable seguidamente pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos se describen posteriormente.

Anticuerpos derivados de biblioteca

Pueden aislarse anticuerpos de la invención mediante el cribado de bibliotecas combinatoriales para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce una diversidad de métodos en la técnica para la generación de bibliotecas de expresión fágica y el cribado de dichas bibliotecas para anticuerpos que presenten las características de unión deseadas. Se proporciona una revisión de tales métodos en, por ejemplo, Hoogenboom H.R. et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente en, por ejemplo, McCafferty J. et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1992; Marks y Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310, 2004; Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093, 2004; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472, 2004, y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132, 2004).

En determinados métodos de expresión fágica, se clonan separadamente repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas fágicas, que seguidamente pueden cribarse para fago ligante de antígeno tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994. Los fagos típicamente expresan fragmentos de anticuerpo, en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio no expuesto puede clonarse (por ejemplo a partir de seres humanos), proporcionando una fuente única de anticuerpos contra un amplio abanico de no autoantígenos y también autoantígenos sin ninguna inmunización, tal como indican Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993. Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas no expuestas, sintéticamente mediante clonación de segmentos de gen V no reorganizados a partir de células madre, utilizando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria que codifica las regiones CDR3 altamente variables y para llevar a cabo la reorganización in vitro, tal como se indica en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381-388, 1992). Entre las publicaciones de patente que describen bibliotecas fágicas de anticuerpos humanos se incluyen, por ejemplo: la patente nº US 5.750.373 y las publicaciones de patente US nº 2005/0079574, nº 2005/0119455, nº 2005/0266000, nº 2007/0117126, nº 2007/0160598, nº 2007/0237764, nº 2007/0292936 y nº 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente memoria.

Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que presentan especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para un antígeno específico y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes del antígeno. También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan el antígeno al que se une el anticuerpo. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Entre las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos se incluyen, aunque sin limitación, la coexpresión recombinante de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que presentan especificidades diferentes (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305:537, 1983, el documento nº WO 93/08829, y Trauneker et al., *EMBO J.* 10:3655, 1991) y las construcciones de "botón-en-ochal" (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos mediante la manipulación de efectos de orientación electrostática para generar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento nº WO 2009/089004 A1), el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, p.ej., la patente nº US 4.676.980 y Brennan et al., *Science* 229:81, 1985), la utilización de cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (ver, p.ej., Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553, 1992), la utilización de tecnología de "diacuerpos" para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, p.ej., Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993) y la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv) (ver, p.ej., Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368, 1994) y la preparación de anticuerpos trispecíficos tal como se indica en, p.ej., Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60, 1991).

Los anticuerpos manipulados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos

Octopus" también se encuentran incluidos en la presente memoria (ver, por ejemplo, el documento nº US 2006/0025576 A1).

5 El anticuerpo o fragmento en la presente memoria también incluye un "Fab de doble acción" o "FDA", que comprende un sitio de unión a hapteno, así como a otro antígeno diferente (ver el documento nº US 2008/0069820, por ejemplo).

Variantes de anticuerpo con afinidad de unión alterada para el antígeno

10 En determinadas realizaciones, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión al antígeno y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Entre dichas modificaciones se incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo de unión a antígeno.

Variantes por sustitución, inserción y deleción

20 En determinadas realizaciones, se proporcionan polipéptidos que comprenden Fc variantes adicionalmente presentan una o más sustituciones de aminoácidos en otras partes de la parte Fc. Entre los sitios de interés de la mutagénesis por sustitución se incluyen las RHV y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla 1, bajo el título de "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1, bajo el título de "sustituciones ejemplares", y tal como se describe adicionalmente después en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo de interés y cribarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo la unión conservada/mejorada a antígeno, una inmunogenicidad reducida.

Tabla 1:

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
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; Ile	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

30 Grupos según propiedades comunes de cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: Ile, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutros hidrofílicos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
- (3) ácidos: Asp, Glu,
- 35 (4) básicos: His, Lys, Arg,
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro,
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

40 Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un elemento de una de dichas clases por uno de otra clase.

Un tipo de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el estudio adicional presentarán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas

propiedades biológicas (por ejemplo una afinidad incrementada, una inmunogenicidad reducida) respecto al anticuerpo parental y/o presentarán determinadas propiedades biológicas conservadas del anticuerpo parental. Una variante por sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente, por ejemplo utilizando técnicas de maduración de la afinidad basadas en la expresión fágica, tales como las descritas en la presente memoria. Brevemente, se muta uno o más residuos de la RHV y los anticuerpos variantes se expresan sobre fagos y se criban para una actividad biológica particular (por ejemplo la afinidad de unión).

Pueden realizarse alteraciones (por ejemplo sustituciones) en las RHV, por ejemplo para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden llevarse a cabo en "puntos calientes" de RHV, es decir, residuos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, p.ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008, y/o RDS (a-RDC) donde la VH o VL variante resultante se somete a ensayo para afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante la construcción y reselección a partir de bibliotecas secundarias ha sido descrita en, por ejemplo, Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). En algunas realizaciones de maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración mediante cualquiera de entre una diversidad de métodos (por ejemplo PCR con tendencia a errores, reorganización de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación se crea una biblioteca secundaria. Seguidamente se criba la biblioteca con el fin de identificar cualesquiera variantes de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a RHV, en los que se aleatorizan varios residuos de la RHV (por ejemplo 4 a 6 residuos de una vez). Los residuos de RHV que participan en la unión del antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo utilizando mutagénesis de escaneo de alaninas o el modelaje. En particular, con frecuencia son dianas CDR-H3 y CDR-L3.

En determinadas realizaciones, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más RHV con la condición de que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse alteraciones conservadoras (por ejemplo sustituciones conservadoras tal como las proporcionadas en la presente memoria) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las RHV. Dichas alteraciones pueden encontrarse fuera de los "puntos calientes" de las RHV o RDE. En determinadas realizaciones de las secuencias de VH y VL variante proporcionadas anteriormente, cada RHV se encuentra no alterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser la diana para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por escaneo de alaninas", tal como se describen en Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989. En este método, un residuo o grupo de residuos diana (p.ej., residuos con carga, tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (p.ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno resulta afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácido, demostrando sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser las dianas o ser eliminadas como candidatos para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Entre las inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen las fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales de longitud comprendida entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de una secuencia de un solo residuo o múltiples residuos aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal. Entre otras variantes por inserción de la molécula de anticuerpo se incluyen la fusión con el extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo con un enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida sérica del anticuerpo.

Variantes por glucosilación

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se altera para incrementar o reducir el grado con el que se glucosila el anticuerpo. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que se genere o se elimine uno o más sitios de glucosilación.

En el caso de que el anticuerpo comprenda una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se une mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, p.ej., Wright et al., *TIBTECH* 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en el anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

Los polipéptidos que comprenden Fc variantes se proporcionan además con oligosacáridos sialilados, p.ej. en los que se proporciona una sialilación diferencial del oligosacárido del núcleo de Fc unido a la región Fc del anticuerpo. Tales

polipéptidos pueden presentar una sialilación incrementada y/o una función de ADCC reducida. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpo en, p.ej., Kaneko et al., Science 313:670-673, 2006.

Variantes de anticuerpo con manipulación de las cisteínas

En determinadas realizaciones puede resultar deseable crear anticuerpos con manipulación de las cisteínas, por ejemplo los "tioMAB", en los que se sustituyen uno o más residuos de un anticuerpo por residuos de cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de aquellos residuos con cisteína, se sitúan los grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros grupos, tales como grupos farmacológicos o grupos de molécula conectora-fármaco, con el fin de crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, puede sustituirse por cisteína uno o más cualesquiera de los residuos siguientes: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración EU) de la cadena pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos con manipulación de cisteínas tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 7.521.541.

Derivados de anticuerpos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones no proteicas adicionales que son conocidas de la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Entre los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitativos de polímeros solubles en agua se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas de preparación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unido al anticuerpo puede variar, y en el caso de que se una más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones entre las que se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que debe mejorarse, la opción de que el derivado de anticuerpo se utilice en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y una fracción no proteica que puede calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, aunque sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan el grupo no proteico hasta una temperatura a las que las células próximas al anticuerpo-grupo no proteico resultan eliminadas.

Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse anticuerpos utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado codificante de una variante de anticuerpo descrito en la presente memoria. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula huésped comprende (por ejemplo ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo una célula Y0, NS0 ó Sp20). En una realización, se proporciona un método de preparación de una variante de anticuerpo, en la que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante del anticuerpo, tal como se ha proporcionado anteriormente, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de una variante de anticuerpo, se aísla un ácido nucleico codificante de un anticuerpo, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procarióticas o eucarióticas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular en el caso de que la glucosilación y la función efectora de Fc no resulten necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, las patentes nº US 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523 (ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology* 248:245-254, 2003 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Tras la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación han sido "humanizadas", resultando en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004, y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

También se derivan células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden utilizarse junto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes nº US 5.959.177, nº US 6.040.498, nº US 6.420.548, nº US 7.125.978 y nº US 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para el crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (células 293 o células renales (BHK), células de Sertoli de ratón (MT4) tal como se indica en, por ejemplo, Mather et al., *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980), células renales de mono (CV1), células renales de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HELA), células renales caninas (MDCK), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), células pulmonares humanas (W138), células hepáticas humanas (Hep G2), tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI, tal como se describe en, por ejemplo, Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1983, células MRC5 y células FS4. Entre otras líneas de células huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO DHFR⁻ (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980) y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, p.ej., Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ).

Ensayos

Pueden identificarse anticuerpos proporcionados en la presente memoria, cribarse o caracterizarse para sus propiedades físicas/químicas y/o actividad biológica mediante diversos métodos conocidos de la técnica.

Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se somete a ensayo un anticuerpo de la invención para su actividad de unión a antígeno, por ejemplo mediante métodos conocidos, tales como ELISA, transferencia western, etc.

En un ensayo competitivo ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a ensayo para su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede encontrarse presente en un sobrenadante del hibridoma. A modo de control se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a antígeno, se elimina el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcaje asociado al antígeno inmovilizado. En el caso de que el marcaje asociado al antígeno inmovilizado se reduzca sustancialmente en la muestra de ensayo respecto a la muestra de control, el resultado indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión al antígeno (ver Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

Inmunoconjugados

La invención proporciona además inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo en la presente memoria conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radioactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (CAF) en el que se conjuga un anticuerpo con uno o más fármacos, incluyendo, aunque sin limitación, un maitansinoide (ver las patentes US nº 5.208.020, nº 5.416.064 y la patente europea nº EP0 425 235 B1); una auristatina, tal como las fracciones de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las patentes US nº 5.635.483 y nº 5.780.588, y nº 7.498.298); una dolastatina, una caliqueamicina o derivado de la misma (ver las patentes US nº 5.712.374, nº 5.714.586, nº 5.739.116, nº 5.767.285, nº 5.770.701, nº 5.770.710, nº 5.773.001, y nº 5.877.296; Hinman, et al., Cancer Res. 53:3336-3342, 1993, y Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928, 1988; una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523, 2006; Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362, 2006; Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721, 2005; Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834, 2000; Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532, 2002; King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343, 2002 y la patente US nº 6.630.579); metotrexato, vindesina, un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortotaxel, un tricoteceno, y CC1065

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo tal como se indica en la presente memoria conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, la cadena A diftérica, fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfarsarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo tal como se describe en la presente memoria conjugado con un átomo radioactivo formando un radioconjugado. Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radioactivos de Lu. Al utilizar el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99m} o I¹²³, o un marcaje de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como obtención de imágenes de resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (PSPD), ciclohexán-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (CCSM), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metil dietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de nucleótidos radioactivos al anticuerpo. Ver el documento nº WO 94/11026. El conector puede ser un "conector cortable" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil a ácidos, un conector sensible a peptidasas, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131, 1992; patente US nº 5.208.020).

Los inmunoconjugados o CAF en la presente memoria contemplan expresamente, aunque sin limitación, tales conjugados preparados con reactivos entrecruzantes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, and sulfo-SMPB, y SVSB (benzoato de succinimidil-(4-vinilsulfona)), los cuales se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de las variantes de anticuerpo proporcionadas en la presente memoria resulta útil para la detección de la unión del antígeno a dicho antígeno en una muestra biológica. El término "detección" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

En una realización, se proporciona una variante de anticuerpo para la utilización en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia del antígeno al que se une dicha variante de anticuerpo en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o conjugado tal como se indica en la presente memoria, bajo condiciones permisivas de la unión del anticuerpo al antígeno, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno. Dicho método puede ser un método in vitro o in vivo. En una realización, se utiliza una variante de anticuerpo para seleccionar los sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo, por ejemplo en el caso de que el antígeno al que se une dicho anticuerpo sea un marcador biológico para la selección de pacientes.

Entre los trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse utilizando un anticuerpo de la invención se incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales y diabetes.

- 5 En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos marcados. Entre los marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, marcajes o grupos que se detectan directamente (tales como marcajes fluorescentes, cromofóricos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como grupos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo mediante una reacción enzimática o una interacción molecular. Entre los
10 marcajes ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los isótopos radioactivos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido, por ejemplo glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con un enzima que utiliza
15 el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor-pigmento, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcajes de espín, marcajes de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

Formulaciones farmacéuticas

- 20 Las formulaciones farmacéuticas de una variante de anticuerpo tal como se describe en la presente memoria se preparan mediante la mezcla de tal anticuerpo que presenta el grado de pureza deseado con uno o más portadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol A. (editor), 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente resultan no tóxicos para el receptor a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales
25 como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10
30 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Entre los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente memoria se incluyen además
35 agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo las glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP ejemplares y métodos de utilización, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente US nº 2005/0260186 y nº 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

- 40 Se describen formulaciones liofilizadas de anticuerpo ejemplares en la patente US nº 6.267.958. Entre las formulaciones acuosas de anticuerpos se incluyen las descritas en la patente US nº 6.171.586 y en el documento nº WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones u tampón de histidina-acetato.

- 45 La formulación en la presente memoria también puede contener más de un ingrediente activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Dichos ingredientes activos se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan efectivas para el propósito pretendido.

- 50 Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A.,
55 editor, 1980. 1980.

- Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, encontrándose las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas.

- 60 Las formulaciones que deben utilizarse para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede alcanzarse fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril.

Métodos y composiciones terapéuticos

- 65 Puede utilizarse cualquiera de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria en métodos terapéuticos.

En un aspecto específico, el polipéptido según la invención se utiliza para tratar una enfermedad. En un aspecto más específico, la enfermedad es tal que resulta favorable que la función efectora de la variante sea fuertemente reducida, por lo menos en 50%, respecto al polipéptido que comprende el polipéptido Fc de tipo salvaje.

5 En un aspecto específico, el polipéptido según la invención se utiliza en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, en la que resulta favorable que la función efectora del polipéptido se reduzca fuertemente en comparación con un polipéptido Fc de tipo salvaje. En un aspecto específico adicional, el polipéptido según la invención se utiliza en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, en la
10 que resulta favorable que la función efectora del polipéptido se reduzca respecto a un polipéptido Fc de tipo salvaje, en por lo menos 20%.

15 Se da a conocer además un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad, en la que resulta favorable que la función efectora de la variante se reduzca fuertemente respecto a un polipéptido Fc de tipo salvaje, que comprende administrar en un individuo una cantidad eficaz del polipéptido según la invención.

Una reducción fuerte de la función efectora es una reducción de la función efectora de por lo menos 50% de la función efectora inducida por el polipéptido de tipo salvaje.

20 Tales enfermedades son, por ejemplo, todas las enfermedades en que la célula diana no debería ser destruida por, por ejemplo, ADCC, ADCP o CDC. Además, ello es cierto para aquellos anticuerpos diseñados para administrar un fármaco (p.ej., toxinas e isótopos) con diana en las células en las que las funciones efectoras mediadas por Fc/FcγR
25 llevan células inmunológicas sanas a la proximidad de la carga letal, resultando en la eliminación de tejido linfóide normal junto con las células diana (Hutchins et al., PNAS USA 92:11980-11984, 1995; White et al., Annu. Rev. Med. 52:125-145, 2001). En estos casos, la utilización de anticuerpos que atraen poco al complemento o a células efectoras resultaría enormemente beneficiosa (ver también Wu et al., Cell Immunol. 200:16-26, 2000; Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604, 2001; patentes US nº 6.194.551, nº 5.885.573 y publicación de patente PCT nº WO 04/029207).

30 En otros casos, por ejemplo en donde el objetivo es bloquear la interacción de un receptor ampliamente expresado con su ligando afín, resultaría ventajoso reducir o eliminar completamente la función efectora del anticuerpo para reducir la toxicidad no deseada. Además, en el caso en que un anticuerpo terapéutico muestra una unión promiscua en varios tejidos humanos, resultaría prudente limitar dirigir la función efectora a un conjunto diverso de tejidos para
35 limitar la toxicidad.

Además, para anticuerpos agonistas resultaría muy útil que estos anticuerpos mostrasen una función efectora reducida.

40 Las condiciones que pueden tratarse con la variante de polipéptido son muchas y entre ellas se incluyen el cáncer (p.ej., en el que la variante de anticuerpo se une al receptor HER2, al receptor de angiopoyetina o al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)); condiciones alérgicas, tales como el asma (con un anticuerpo anti-IgE) y trastornos mediados por LFA-1 (p.ej. En los que la variante de polipéptido es un anticuerpo anti-LFA-1 o anti-ICAM-1), y trastornos neurológicos y metabólicos.

45 En el caso de que el anticuerpo se una al receptor de HER2, el trastorno preferentemente es cáncer que expresa HER2, p.ej. un tumor benigno o maligno caracterizado por la sobreexpresión del receptor HER2. Entre tales cánceres se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cáncer de mama, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer vulvar,
50 cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La variante de polipéptido o anticuerpo se administra por cualesquiera medios adecuados, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, la variante de anticuerpo se administra convenientemente mediante infusión por pulsos, en particular con dosis decrecientes de la variante de polipéptido. Preferentemente, la administración se realiza mediante inyecciones, lo más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.
55

60 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de variante de polipéptido o anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si la variante de polipéptido se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta a la variante de polipéptido, y del criterio del médico responsable. La variante de polipéptido se
65 administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo de entre 0,1 y 20 mg/kg) de variante de polipéptido o anticuerpo para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona una variante de anticuerpo o polipéptido para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta un cáncer, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de la variante de anticuerpo. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una variantes de anticuerpo para la utilización en la inhibición de la angiogénesis, en la inhibición de la proliferación celular o en la reducción del número de células B en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de la variante de anticuerpo para inhibir la angiogénesis, inhibir la proliferación celular o reducir el número de células B en un "individuo", que según cualquiera de las realizaciones anteriores preferentemente es un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de una variante de anticuerpo o polipéptido en la manufacturación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento del cáncer o de infecciones inflamatorias. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de tratamiento del cáncer, diabetes, trastornos neuronales o inflamatorias, que comprende administrar en un individuo que presenta cáncer, diabetes, trastornos neuronales o inflamatorios, una cantidad efectiva del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la inhibición de la angiogénesis, a la inhibición de la proliferación celular o a la reducción del número de células B.

En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de inhibición de la angiogénesis, de inhibición de la proliferación celular o de reducción del número de células B en un individuo, que comprende administrar en un individuo una cantidad eficaz del medicamento destinado a inhibir la angiogénesis, inhibir la proliferación celular o reducir el número de células B. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las variantes de anticuerpo proporcionadas en la presente memoria, por ejemplo para la utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las variantes de anticuerpo proporcionadas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las variantes de anticuerpo proporcionadas en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se indica posteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, puede coadministrarse un anticuerpo de la invención con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Tales terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualesquiera medios adecuados, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede realizarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se encuentran contempladas dentro de la presente memoria diversos programas de dosificación, aunque sin limitación, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos del tiempo, la administración de bolo y la infusión de pulsos.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse, dosificarse y administrarse de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores

conocidos por el profesional médico. El anticuerpo opcionalmente, no necesariamente, se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan en las mismas dosis y por vías de administración tales como las indicadas en la presente memoria, o entre aproximadamente 1% y 99% de las dosis indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que resulta apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (utilizado solo o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, del tipo de anticuerpo, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg) para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. De esta manera, pueden administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ó 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos). Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriormente indicados puede llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a un anticuerpo según la invención.

Artículos fabricados

En otro aspecto, se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un complejo de la invención, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente adicional citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo fabricado en la presente realización puede comprender además un impreso en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos fabricados anteriormente indicados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en sustitución o adicionalmente a una variante de anticuerpo.

Usos no terapéuticos del polipéptido

La variante de anticuerpo de la invención puede utilizarse como agente de purificación por afinidad. En este procedimiento, las variantes de anticuerpo se inmovilizan sobre una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos de la técnica. La variante de polipéptido inmovilizada se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno que debe purificarse y después se lava el soporte con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente la totalidad del material en la muestra, excepto en el antígeno que debe purificarse, que se encuentra unido a la variante de anticuerpo inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante de polipéptido.

La variante de anticuerpo también puede resultar útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero.

5 Para aplicaciones diagnósticas, la variante de anticuerpo típicamente se marca con una fracción detectable. Se dispone de numerosos marcajes, los cuales pueden clasificarse generalmente en las categorías siguientes:

10 (a) Isótopos radioactivos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . La variante de polipéptido puede marcarse con el isótopo radioactivo utilizando las técnicas descritas en Coligen et al., *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs., 1991, por ejemplo y la radioactividad puede medirse utilizando el recuento de centelleo.

15 (b) Marcajes fluorescentes, tales como quelatos de tierra rara (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo Texas, se encuentran disponibles. Los marcajes fluorescentes pueden conjugarse con la variante de polipéptido utilizando las técnicas dadas a conocer en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro.

20 (c) Diversos marcajes de sustrato enzimático se encuentran disponibles y la patente US 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de ellos. El enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, el enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio de la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y seguidamente puede emitir luz que puede medirse (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcajes enzimáticos se incluyen luciferasas (p.ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasas tales como peroxidasa de rábano picante (PRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en: *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166, 1981.

Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

35 (i) peroxidasa de rábano picante (PRP) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de pigmento (por ejemplo ortofenilén-diamina (OFD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB)),
 (ii) fosfatasa alcalina (FA) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico, y
 (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

40 Se encuentran disponibles para el experto en la materia numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de ellas, ver la patente US nº 4.275.149 y nº 4.318.980.

45 En ocasiones, el marcaje se conjuga indirectamente con la variante de polipéptido. El experto en la materia conocerá diversas técnicas para conseguir lo anterior. Por ejemplo, la variante de polipéptido puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcaje indicadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, de esta manera, el marcaje puede conjugarse con la variante de polipéptido de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcaje con la variante de anticuerpo, ésta se conjuga con un hapteno pequeño (p.ej., digoxina) y se conjuga uno de los diferentes tipos de marcaje indicados anteriormente con una variante de polipéptido anti-hapteno (p.ej., anticuerpo anti-digoxina). De esta manera, puede llevarse a cabo la conjugación indirecta del marcaje con el polipéptido variante.

50 En otra realización de la invención, la variante de anticuerpo no necesita marcarse y la presencia de la misma puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se une al polipéptido variante.

55 La variante de anticuerpo de la presente invención puede utilizarse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación.; Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 1987, páginas 147 a 158, CRC Press, Inc..

60 La variante de anticuerpo puede utilizarse además para ensayos diagnósticos in vivo. Generalmente, el polipéptido variante se marca con un radionucleido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de manera que el antígeno o las células que lo expresan pueden localizarse utilizando inmunoescintigrafía. Aunque la invención anteriormente proporcionada ha sido descrita en detalle a título ilustrativo y ejemplar con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativas del alcance de la invención.

65

Descripción del listado de secuencias

SEC ID nº 1	Cadena ligera kappa humana
SEC ID nº 2	Cadena ligera lambda humana
SEC ID nº 3	IgG1 humana (alotipo caucásico)
SEC ID nº 4	IgG1 humana (alotipo afroamericano)
SEC ID nº 5	IgG1 humana mutante LALA (alotipo caucásico)
SEC ID nº 6	IgG4 humana
SEC ID nº 7	IgG4 humana mutante SPLE que representa las secuencias humanas ejemplares para la cadena ligera kappa, la cadena ligera lambda, IgG1 e IgG4, que podrían servir como base para generar las variantes según la invención.
	En los Id de secuencia 3 a 5, la secuencia de los alotipos de IgG1 humana, la región P329 según el índice EU de Kabat se encuentra situada en la posición 212, mientras que dicha región P329 en la secuencia Id nº 6 y nº 7 puede encontrarse en la posición 209.
SEC ID nº 8	Cadena ligera kappa de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 9	Cadena pesada de IgG1 de tipo salvaje de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 10	Cadena pesada de IgG1 P329G de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 11	Cadena pesada de IgG1 LALA / P329G de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 12	Cadena pesada de IgG4 SPLE de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 13	Cadena pesada de IgG4 SPLE / P329G de mAb 40A746.2.3
SEC ID nº 14	Cadena pesada de IgG1 LALA de mAb 40A746.2.3

5 Ejemplos

Los siete ejemplos a continuación son ejemplos de métodos y composiciones de la invención según las reivindicaciones, junto con una exposición comparativa. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

10 Aunque la invención anteriormente proporcionada ha sido descrita en cierto detalle a título ilustrativo y ejemplar con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

15 Ejemplo 1**Anticuerpos**

20 Para los experimentos descritos a continuación, se utilizaron anticuerpos contra CD9 (ver las SEC ID 8-14), selectina-P (secuencias indicadas en el documento nº WO 2005/100402) y CD20 (sinónimo: GA101, secuencias indicadas en la patente nº EP 1.692.182).

25 Todas las variantes indicadas en la presente memoria, p.ej. variantes P329G, P329A, P329R SPLE, LALA, P329G/LALA, P329G/SPLE de la selectina, anticuerpos de unión de CD9, de CD20 (GA101) y de CD20 glucomanipulado (numeración según la nomenclatura de EU), se generaron utilizando la mutagénesis basada en PCR. Las moléculas de IgG se expresaron en el sistema HEK-EBNA o HEK293 (Fc variantes de CD9) y se purificaron utilizando la cromatografía de proteína A y de exclusión por tamaño.

30 Ejemplo 2**Determinación de las afinidades de unión de diferentes receptores de Fcγ a inmunoglobulinas**

35 Se midieron las afinidades de unión de diferentes FcγR para las inmunoglobulinas mediante resonancia del plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) a 25°C.

40 El sistema BIAcore® está bien establecido para el estudio de las interacciones entre moléculas. Permite un seguimiento en tiempo real continuo de unión de ligando/analito y, de esta manera, la determinación de constantes de tasa de asociación (k_a), constantes de tasa de disociación (k_d) y constantes de equilibrio (K_D). Los cambios en el índice refractivo indica cambios de masa sobre la superficie causados por la interacción de ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. En el caso de que moléculas se unan a ligandos inmovilizados sobre la superficie, se incrementa la masa; en el caso de disociación, se reduce la masa.

45 Para una interacción 1:1, no deberían observarse diferencias en los resultados al inyectar o inmovilizar sobre una superficie una molécula de unión. Por lo tanto, se utilizaron diferentes ajustes (con receptor de Fcγ como ligando o analito, respectivamente), según la solubilidad y disponibilidad del ligando o analito correspondiente.

5 Para FcγRI, se inmovilizaron 10.000 unidades de resonancia (UR) de un sistema de captura que reconocía una secuencia polihistidina (anticuerpo monoclonal pentaHis, Qiagen Hilden, nº de cat. 34660) mediante la utilización de un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE Healthcare y un chip CM5 a pH 4,5. Se capturó FcγRI a una concentración de 5 µg/ml con un pulso de 60 s a un caudal de 5 µl/min. Se pasaron diferentes concentraciones de anticuerpos, de 0 a 100 nM, a un caudal de 30 µl/min por las celdas de flujo a 298°K durante 120 s para registrar la etapa de asociación. Se realizó un seguimiento de la etapa de disociación durante hasta 240 s y se indujo mediante el cambio de solución para muestras a tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 2 min con una solución de glicina, pH 2, a un caudal de 30 ml/min. Para todos los experimentos se seleccionó el tampón HBS-P+ suministrado por GE Healthcare (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05% (v/v)). Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie sin FcγRI capturado. También se restaron las inyecciones de blanco (=doble referenciado)

15 La constante de equilibrio de disociación (K_D), definida como K_a/k_d , se determinó mediante el análisis de las curvas de sensogramas obtenidas con varias concentraciones diferentes, utilizando el paquete de software BIAevaluation. El ajuste de los datos siguió un modelo de unión adecuado.

20 Para FcγRIIA y FcγRIIAV158, se inmovilizaron 10.000 unidades de resonancia (UR) de un anticuerpo monoclonal para el análisis, sobre un chip CM5 mediante la utilización de un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE (pH 4,5 a una concentración de 10 µg/ml).

25 Se pasaron diferentes concentraciones de FcγRIIA y IIAA, de 0 a 12.800 nM, a un caudal de 5 µl/min por las celdas de flujo a 298°K durante 120 s para registrar la etapa de asociación. Se realizó un seguimiento de la etapa de disociación durante hasta 240 s y se indujo mediante el cambio de solución para muestras a tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 0,5 min con una solución de NaOH 3 mM/NaCl 1 M a un caudal de 30 ml/min. Para todos los experimentos se seleccionó el tampón HBS-P+ suministrado por GE Healthcare (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05% (v/v)).

30 Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie sin anticuerpo capturado. También se restaron las inyecciones de blanco (=doble referenciado)

35 La constante de equilibrio de disociación (K_D) se determinó mediante el análisis de las curvas de sensogramas obtenidas con varias concentraciones diferentes, utilizando el paquete de software BIA Evaluation. El ajuste de los datos siguió un modelo de unión adecuado utilizando un ajuste de estado estable.

40 Para FcγRIIB, se inmovilizaron 10.000 unidades de resonancia (UR) de un sistema de captura que reconocía una secuencia polihistidina (anticuerpo monoclonal pentaHis, Qiagen Hilden, nº de cat. 34660) mediante la utilización de un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE Healthcare y un chip CM5 a pH 4,5. Se capturó FcγRIIB a una concentración de 5 µg/ml con un pulso de 120 s a un caudal de 5 µl/min. Se pasaron diferentes anticuerpos a una concentración de 1.340 nM, a un caudal de 5 µl/min, por las celdas de flujo a 298°K durante 60 s para registrar la etapa de asociación. Se realizó un seguimiento de la etapa de disociación durante hasta 120 s y se indujo mediante el cambio de solución para muestras a tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 0,5 min con una solución de glicina, pH 2,5, a un caudal de 30 ml/min. Para todos los experimentos se seleccionó el tampón HBS-P+ suministrado por GE Healthcare (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05% (v/v)).

45 Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie sin FcγRIIB capturado. También se restaron las inyecciones de blanco (=doble referenciado)

50 Debido a la muy baja afinidad intrínseca de FcγRIIB para la IgG1 de tipo salvaje, no se calculó ninguna afinidad sino que se evaluó la unión cualitativamente.

55 Las tablas a continuación resumen los efectos de introducir una mutación en la parte Fc sobre la unión a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIAV1-58 (A), así como el efecto sobre la ADCC (medida sin (BLT) y con células diana (ADCC)) y sobre la unión de C1q (B).

Table 2A:

	FcγRI	FcγRIIAr131	FcγRIIAV158	FcγRIIB
IgG1 WT	++ (5 nM)	++ (2 µM)	+ (0,7 µM)	++
IgG4 SPLE	-	+/- (10 µM)	- (>20 µM)	+
IgG1 P329G	++ (6 nM)	- (>20 µM)	- (>20 µM)	-
IgG1 P329A ge	++ (8 nM)	+ (4,4 µM)	+ (1,8 µM)	+
IgG1 P329G LALA	-	- (>20 µM)	- (>20 µM)	-
IgG1 P329G ge	++ (10 nM)	- (>20 µM)	- (>10 µM)	-
			*** para IgG1 ge	
			30 nM	

Tabla 2B:

Mutante	FcγRI	FcγRII	FcγRIII	C1q		ADCC sin células diana	ADCC con células diana
	BIACore	BIACore	BIACore	CDC	C1q	BLT	ADCC
Ensayo	+	--	--	--	--	--	--
P329G	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	--
P329R	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	--
LALA	--	--	--	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IgG LP329G/LALA	--	-	--	--	--	n.d.	n.d.

-- fuertemente reducido/inactivo en contraste con el tipo salvaje (wt), - reducido en contraste con wt, + comparable con la interacción del wt, n.d. no determinado / sin resultado

5 En mayor detalle, se obtuvieron los resultados siguientes:

Afinidad para el receptor FcγRI

10 Se introdujeron mutaciones P329G, P329A, SPLE y LALA en el polipéptido Fc de un anticuerpo de selectina-P, CD20 y CD9, y se midió la afinidad de unión para FcγRI con el sistema Biacore. Mientras que el anticuerpo con la mutación P329G todavía se une a FcγRI (fig. 1a y 1b), la introducción de las mutaciones triples P329G / LALA y P329G / SPLE, respectivamente, resultó en anticuerpo para los que prácticamente no pudo detectarse unión (fig. 1b). Las mutaciones LALA o SPLE redujeron la unión al receptor más que P329G solo pero menos que en combinación con P329G (fig. 1a y 1b). De esta manera, la combinación de P329G con las mutaciones LALA o SPLE resulta mucho más eficaz que la mutación P29G o las mutaciones dobles LALA o SPLE solas. El valor de kd para el anticuerpo IgG1 de tipo salvaje de CD20 era 4,6 nM y para el mutante P329G del mismo anticuerpo, de 5,7 nM, pero para el triple mutante P329G/LALA, no pudo determinarse ningún valor de kd debido a la unión prácticamente indetectable del anticuerpo al receptor de FcγRI. El anticuerpo mismo, es decir, se haya sometido a ensayo un CD9 o CD20 o selectina-P, presenta un efecto menor sobre las afinidades de unión.

Afinidad para el receptor FcγRIIA

25 Se introdujeron las mutaciones P329G, SPLE y LALA, respectivamente, en el polipéptido Fc del anticuerpo CD9 y se midió la afinidad de unión al receptor FcγRIIA-R131 con el sistema Biacore. Se normalizó el nivel de unión de manera que el mA b capturado representa 100 UR. Por lo tanto, no se espera más de aproximadamente 20 UR para una estequiometría 1:1. La fig. 1c muestra que la unión al receptor FcγRIIA resulta fuertemente reducida por la introducción de la mutación LALA, SPLE/P329G, P329G y LALA/P329G en la Fc variante. En contraste con la unión al receptor FcγRI, la introducción de la mutación P329G sola fe capaz de bloquear muy fuertemente la unión a dicho receptor, más o menos en un grado similar a la triple mutación P329G / LALA (fig. 1c).

Afinidad para el receptor FcγRIIB

35 Se introdujeron las mutaciones SPLE, LALA, SPLE/P329G y LALA/P329G, respectivamente, en el polipéptido Fc de los anticuerpos CD9 y selectina-P y se midió la afinidad de unión al receptor FcγRIIB con el sistema Biacore. La fig. 1d muestra que la unión al receptor FcγRIIB resultó fuertemente reducida en los mutantes LALA y triple mutantes P329G/LALA, P329G / SPLE.

Afinidad para el receptor FcγRIIIA

40 Se introdujeron las mutaciones P329G, LALA, SPLE, P329G/LALA y SPLE/P329G en el polipéptido Fc del anticuerpo CD9 y se midió la afinidad de unión al receptor FcγRIIIA-V158 con el sistema Biacore. La mutación P329G y la triple mutación P329G/LALA redujeron la unión al receptor FcγRIIIA más fuertemente, hasta niveles prácticamente indetectables. La mutación P329G/SPLE también condujo a una afinidad de unión fuertemente reducida; las mutaciones SPLE y LALA, respectivamente, sólo redujeron ligeramente la afinidad de unión para el receptor FcγRIIIA (fig. 1e).

Ejemplo 3

ELISA de C1Q

50 Las propiedades de unión de los diferentes polipéptidos que comprenden Fc variantes a C1q se analizaron mediante un inmunoensayo ELISA de tipo sándwich. Se acopló cada variante con una placa Maxisorp de 96 pocillos hidrofóbica a 8 concentraciones de entre 10 µg/ml y 0 µg/ml. Este acoplamiento estimula complejos de anticuerpos, lo que es un requisito previo para la unión de alta afinidad de la molécula de C1q. Tras el lavado, las muestras se incubaron para permitir la unión de C1q. Tras un lavado adicional, la molécula de C1q unida se detectó con un anticuerpo policlonal

de conejo anti-C1q_h. Después de la siguiente etapa de lavado, se añadió un anticuerpo específico anti-Fc γ de conejo marcado enzimáticamente. La reacción inmunológica se hace visible mediante la adición de un sustrato que se convierte en un producto coloreado por el enzima. La absorbancia resultante, medida fotométricamente, es proporcional a la cantidad de C1q unida al anticuerpo que debe investigarse. Se calcularon los valores de EC₅₀ de la interacción variante-C1q. Las unidades de absorción resultante de la reacción de coloración se representaron gráficamente frente a la concentración del anticuerpo. La concentración de anticuerpo a la que se produce una respuesta semimáxima determina el valor de EC₅₀. Este resultado se expresa como diferencia relativa al estándar de referencia medida en la misma placa junto con el coeficiente de variación de la muestra y de la referencia.

La mutación P329G introducida en el anticuerpo de selectina-P o CD20 redujo fuertemente la unión a C1q, de manera similar a la mutación SPLE (fig. 2). La Tabla 3 resume los valores calculados de EC₅₀ para la unión de las variantes al receptor de C1q. C1q pertenece a las proteínas de activación del complemento y desempeña un papel importante en la activación de la ruta clásica del complemento, que conduce a la formación del complejo de ataque membranal. C1q también participa en otros procesos inmunológicos, tales como la potenciación de la fagocitosis, la eliminación de células apoptóticas o la neutralización de virus. De esta manera, puede esperarse que los mutantes que se muestra en la presente memoria que reducen la unión a C1q, p.ej. P329G y SPLE, así como muy probablemente también las triple mutaciones que comprenden las mutaciones individuales anteriormente indicadas, reduce fuertemente las funciones anteriormente indicadas de C1q.

Tabla 3:

Anticuerpo	valor de IC ₅₀
IgG1wt de selectina-P	1,8
IgG1wt GA101	2,4
IgG1 P329G de selectina-P	2,7
IgG4 SPLE de selectina-P	3,0
GA101 IgG1 P329G	5,5
IgG4 SPLE GA101	>10

Ejemplo 4

ADCC sin células diana, ensayo BLT

Los anticuerpos que debían someterse a ensayo (CD20 (GA101) y CD9) se recubrieron en PBS durante la noche a 4°C en placas de 96 pocillos de fondo plano adecuadas. Tras el lavado de la placa con PBS, se bloquearon los sitios de unión restantes con solución de PBS/BSA al 1% durante 1h a TA. En paralelo, las células efectoras (línea celular NK-92 transfectada para expresar Fc γ RIII humano de baja o alta afinidad) se recolectaron y se sembraron 200.000 células vivas/pocillo en 100 μ l/pocillo de medio AIM V en los pocillos después de descartar el tampón de bloqueo. Se utilizaron 100 μ l/pocillo de tampón de saponina (saponina al 0,5% + BSA al 1% en PBS) para determinar la liberación de esterasa máxima por las células efectoras. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C con 5% de CO₂ en un incubador. Tras 3 h, se mezclaron 20 μ l/pocillo de los sobrenadantes con 180 μ l/pocillo de sustrato BLT (BLT 0,2 mM + DTNB 0,11 mM en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0) y se incubaron durante 30 min a 37°C antes de leer la placa a 405 nm en un lector de microplacas. Se determinó el porcentaje de liberación de esterasa fijando la liberación máxima (células tratadas con saponina) en 100% y las células no estimuladas (sin recubrimiento de anticuerpo) a 0% de liberación.

El anticuerpo CD20 de tipo salvaje (GA101 wt (1)) mostraba una fuerte inducción de la actividad citolítica. La variante LALA mostraba una reducción marcada de la liberación de esterasa, mientras que las variantes P329G y P329G/LALA no mostraron ninguna actividad de ADCC (fig. 3a). La fig. 3b mostraba no sólo que un intercambio de G en la posición P329 conducía a una actividad citosólica marcadamente reducida sino también un intercambio de P329 por R329 (anticuerpo CD20). De esta manera, la arginina aparentemente destruye la función del sándwich de prolina en el anticuerpo, de manera similar a la glicina. La ADCC fuertemente reducida observada en la presente memoria para el mutante P329G muy probablemente resulta de la unión fuertemente reducida a los receptores Fc γ RIIA y Fc γ RIIAA (ver la fig. 1c y la fig. 1e).

Ejemplo 5

ADCC con células diana

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) como células efectoras y se prepararon utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO3178 USA) y siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Brevemente, se extrajo sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios. Se diluyó la sangre 1:0,75-1,3 con PBS (que no contenía Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺) y se aplicó en capas sobre Histopaque-1077. Se centrifugó el gradiente a 400xg durante 30 min a temperatura ambiente (TA) sin frenos. Se recolectó la interfase que contenía las CMSP y se lavó con PBS (50 ml para células de dos gradientes) y se recolectaron mediante centrifugación a 300xg durante 10 minutos a TA. Tras la resuspensión del pellet con PBS, se contaron las CMSP y se lavaron una

segunda vez mediante centrifugación a 200xg durante 10 minutos a TA. A continuación, se resuspendieron las células en el medio apropiado para los procedimientos posteriores. La proporción de efector a diana para los ensayos de ADCC era de 25:1 y de 10:1 para las células CMSP y NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la concentración apropiada con el fin de añadir 50 ml por pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana eran células de linfoma B humano (p.ej., células Raji) cultivada en DMEM que contenía FCS al 10%. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a razón de 0,3 millones por ml con el fin de añadir 30.000 células a 100 ml por micropocillo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50 ml a las células diana pre-sembradas y se dejó que se uniesen a las dianas durante 10 minutos a TA. A continuación, se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Se evaluó la eliminación de las células diana mediante la medición de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de las células dañadas utilizando el kit de detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Tras una incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800xg y se transfirieron 100 ml de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa transparente de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron a cada pocillo 100 ml de tampón de sustrato de color del kit. Se determinaron los valores de V_{max} de la reacción de coloración en un lector ELISA a 490 nm durante como mínimo 10 min utilizando el software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Se midió la liberación espontánea de LDH de los pocillos que contenían sólo células diana y efectoras, pero no anticuerpos. Se determinó la liberación máxima de los pocillos que contenían sólo células diana y Triton X-100 al 1%. Se calculó el porcentaje de eliminación específica mediada por anticuerpo, de la manera siguiente: $((x - SR)/(MR - SR)) \times 100$, en donde x es la media de V_{max} a una concentración específica de anticuerpo, SR es la media de V_{max} de la liberación espontánea y MR es la media de V_{max} de la liberación máxima.

La potencia de atraer células efectoras inmunológicas depende del tipo de variante de Fc, según se mide mediante un ensayo de ADCC clásico. La línea celular NK92 humana transfectada con FcγRIIIA humano se utilizó como efector y se utilizaron células Raji positivas para CD20 como células diana. Tal como puede observarse en la fig. 4a, la ADCC resultó fuertemente reducida en Fc variantes GA101 (CD20) en las que la glicina sustituye a la prolina (P329G) también, en un grado similar, en el doble mutante P329G / LALA. En contraste, la reducción de la ADCC fue menos fuerte con la mutación LALA. Con el fin de distinguir mejor entre las diferentes variantes, las variantes también se produjeron en la versión glucomanipulada para potenciar el potencial de ADCC. Puede observarse que la molécula parental (GA101 (CD20)) muestra una ADCC fuerte, tal como se esperaba. La versión LALA era fuertemente defectuosa en su potencial de ADCC. El mutante P329G redujo muy fuertemente la ADCC, mucho más que una variante P329G del anticuerpo GA101 (CD20) (fig. 4b).

Ejemplo 6

Actividad del complemento

Se contaron las células diana, se lavaron con PBS, se resuspendieron en AIM-V (Invitrogen) a razón de 1 millón de células por ml. Se sembraron 50 ml de células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se prepararon diluciones de anticuerpos en AIM-V y se añadieron en 50 ml a las células. Se dejó que los anticuerpos se uniesen a las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. El complemento de suero humano (Quidel) se descongeló al momento, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 ml a los pocillos. Se preparó complemento de conejo (Cedarlane Laboratories) se descongeló al momento, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 ml a los pocillos. Como control, se calentaron fuentes de complemento durante 30 min a 56°C antes de la adición al ensayo. Las placas de ensayo se incubaron durante 2 h a 37°C. Se determinó la eliminación de las células mediante la medición de la liberación de LDH. Brevemente, las placas se centrifugaron a 300xg durante 3 min. Se transfirieron 50 ml de sobrenadante por pocillo a una nueva placa de 96 pocillos y se añadieron 50 ml del reactivo de ensayo del kit de citotoxicidad (Roche). Una medición cinética con el lector ELISA determinó la V_{max} correspondiente a la concentración de LDH en el sobrenadante. Se determinó la liberación máxima mediante la incubación de las células en presencia de Triton X-100 al 1%.

Se analizaron las diferentes Fc variantes para mediar en la CDC sobre las células diana SUDH-L4. La molécula GA101 no glucomanipulada muestra una clara inducción de CDC. La variante LALA mostraba actividad a la concentración más alta, mientras que las variantes P329G y P329G/LALA no mostraban ninguna actividad de CDC (fig. 5a). Además, la variante LALA, así como las variantes P329G y P329A de una molécula GA101 glucomanipulada no mostraban ninguna actividad de CDC (fig. 5b).

Ejemplo 7

Perfil de carbohidratos de la IgG1 humana

Se analizaron los perfiles de carbohidratos de los anticuerpos IgG1 humanos que contenían mutaciones dentro de Fc, destinadas a anular la unión a los receptores de Fcγ, mediante MALDI/TOF-EM en modo de iones positivos (oligosacáridos neutros).

Se trataron variantes de IgG1 (h) humana con sialidasa (QA-Bio) siguiendo las instrucciones del fabricante para

eliminar el ácido siálico terminal. Los oligosacáridos neutros de IgG1_h se liberaron posteriormente mediante digestión con PNGasa F (QA-Bio) tal como se ha descrito anteriormente (Ferrara C. et al., Biotech. Bioeng. 93:851-861, 2006). Los perfiles de carbohidratos se analizaron mediante espectrometría de masas (Autoflex, Bruker Daltonics GmbH) en modo de iones positivos tal como se ha descrito anteriormente (Ferrara C. et al. Biotech. Bioeng. 93:851-861, 2006).

5 El perfil de carbohidratos de los glicanos asociados a Fc neutros de IgG1 humana se caracteriza por tres picos principales de m/z, que pueden asignarse a oligosacáridos complejos fucosilados con ningún (G0), un (G1) o dos (G2) residuos terminales de galactosa.

10 Los perfiles de carbohidratos de IgG1_h que contenían mutaciones dentro de Fc, destinadas a anular la unión a receptores de Fc, se analizaron y se compararon con el obtenido para el anticuerpo de tipo salvaje. Las variantes de IgG que contenían una de las mutaciones dentro de Fc (P329G, LALA, P329A y P329G/LALA) mostraban perfiles de carbohidratos similares al del anticuerpo de tipo salvaje, siendo los glicanos asociados a Fc, oligosacáridos complejos fucosilados (datos no mostrados). La mutación dentro de Fc puede afectar al nivel de galactosilación terminal y de sialilación terminal, tal como se observa al sustituir el aminoácido en las posiciones 241, 243, 263, 265 o 301 por alanina (Lund J. et al., J. Immunol. 157:4963-4969, 1996).

La figura 6a muestra el porcentaje relativo de galactosilación para las diferentes variantes de Fc de IgG1_h indicadas en la presente memoria. Pueden observarse variaciones ligeras al expresar los anticuerpos en un huésped diferente, pero no pudo observarse ninguna diferencia significativa en galactosilación terminal.

La figura 6b indica la variabilidad en el contenido de galactosilación para IgG1-P329G/LALA y de tipo salvaje para 4 anticuerpos diferentes, donde se compararon cuatro dominios V diferentes para su nivel de galactosilación al expresarlo en células EBNA Hek293.

25 Ejemplo 8

Agregación plaquetaria inducida por anticuerpos en ensayo de sangre completa.

30 Análisis de agregación de plaquetas de sangre completa utilizando el instrumento Multiplate de Dynabyte. En primer lugar, se extrajeron 20 ml de sangre de donantes humanos normales y se transfirieron a tubos con hirudina (Dynabyte Medical, nº MP0601). Para el ensayo se utilizó un dispositivo de impedancia Plug minicell (Dynabead nº MP0021) en el instrumento multiplaca para el ensayo. A continuación, se añadieron 175 µl de NaCl al 0,9% a la minicelda. Se añadió anticuerpo a la minicelda para obtener la concentración final del ensayo. A continuación, se añadieron 175 µl de sangre humana y se incubaron durante 3 min a 37°C. Inicio automatizado del análisis de impedancia durante 6 min adicionales a 37°C. Los datos se analizaron mediante cuantificación de la superficie bajo la curva como medida de la agregación plaquetaria.

40 Se ha demostrado que el anticuerpo de CD9 induce la activación y agregación plaquetarias (Worthington et al., Br. J. Hematol. 74(2):216-222, 1990). Se ha demostrado que la agregación plaquetaria inducida por anticuerpos ligantes de plaquetas implica la unión a FcγRIIA (de Reys et al., Blood 81:1792-1800, 1993). Tal como se ha mostrado anteriormente, las mutaciones LALA, P329G, P329G/LALA y P329G/SPLE introducidas en el anticuerpo de CD9 redujeron fuertemente la unión del anticuerpo de CD9 al receptor FcγRIIA (fig. 1c).

45 La activación (medida por el flujo de salida de Ca, datos no mostrados), así como la agregación plaquetaria inducida por un anticuerpo de CD9 se eliminó mediante la introducción de triples mutaciones P329G y LALA en el anticuerpo, de manera que la unión de FcγRIIA se encontraba fuertemente reducida en comparación con el anticuerpo de tipo salvaje (ver las figs. 7a y 7b). La IgG1 murina indujo agregación plaquetaria a concentraciones de anticuerpo bajas (0,1 a 1 µg/ml). A concentraciones más altas, la sobreestimulación de las plaquetas conduce al silenciamiento de la respuesta de agregación (3 a 30 µg/ml). Se observó variabilidad del donante con IgG4_quim_hu-SPLE. En la fig. 6a, se muestran datos de un respondedor IgG4_quim_hu-SPLE a concentraciones de anticuerpo más altas y en la fig. 6b, datos para un no respondedor IgG4_quim_hu-SPLE. Ningunas de las muestras de sangre mostró ninguna respuesta de agregación con las variantes de anticuerpo IgG1_quim_hu-LALA, IgG_quim_hu-WT-P329G, IgG1_quim_hu-LALA-P329G, IgG4_quim_hu-SPLE-P329G, IgG4_quim_hu-SPLE-N297Q. Controles: agregación espontánea en muestra de sangre no tratada (fondo); agregación plaquetaria inducida por ADP (ADP) e inducida por análogo de trombina (TRAP6). Controles de isotipo: Ig1 murina (isotipo murino) e IgG4-SPLE humano (isotipo de IgG4_hu-SPLE).

60 Una posible interpretación de estos datos es que la unión reducida del anticuerpo de CD9 con las mutaciones triples al receptor FcγRIIA es el motivo para la agregación plaquetaria reducida que se observa con estos tipos de anticuerpos mutantes. En principio, el bloqueo de la agregación de trombocitos, como efecto secundario tóxico de un tratamiento de anticuerpos, podría resultar posible de esta manera, mediante la introducción de las mutaciones anteriormente indicadas, capaces de reducir la unión al receptor FcγRIIA, en la parte Fc de un anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

<120> Antibody Fc Variants

5 <130> 27397 WO

<150> EP11160251
<151> 2011-03-29

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 1
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

15 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 2
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 2
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

ES 2 692 268 T3

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
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

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 2 692 268 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> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 4
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

ES 2 692 268 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 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
 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
 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 Glu Glu
 225 230 235 240
 Met 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

ES 2 692 268 T3

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> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5
 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

Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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

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

ES 2 692 268 T3

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> 6
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 6
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

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

ES 2 692 268 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

ES 2 692 268 T3

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> LC_1_1-PEP

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Asn Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

10

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

ES 2 692 268 T3

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

ES 2 692 268 T3

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

ES 2 692 268 T3

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

ES 2 692 268 T3

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

ES 2 692 268 T3

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

ES 2 692 268 T3

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 14
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 8205_HC_IGG1_LALA-PEP

<400> 14

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

10

ES 2 692 268 T3

Glu Gly Gly Asn Tyr Arg Tyr Ser Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

ES 2 692 268 T3

			340						345								350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
385					390					395					400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				405					410					415			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435					440					445					
Lys																	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende una Fc variante de una región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje, en el que la Fc variante de la región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje contiene las sustituciones de aminoácidos P329G, L234A y L235A, donde los residuos están numerados según el índice EU de Kabat.
- 10 2. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según la reivindicación 1, donde la región de IgG1 humana de tipo salvaje induce una ADCC y donde la ADCC inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la Fc variante de IgG1 se encuentra reducida a 0-20% de la ADCC inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de la IgG1 humana de tipo salvaje.
- 15 3. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la Fc variante, muestra una afinidad reducida o anulada para un receptor de Fc responsable de una función efectora en comparación con el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de la IgG1 humana de tipo salvaje.
- 20 4. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de la IgG1 humana de tipo salvaje induce la agregación de trombocitos y donde la agregación de trombocitos inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la Fc variante de IgG1 se encuentra reducida en comparación con la agregación de trombocitos inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de la IgG1 humana de tipo salvaje.
- 25 5. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje induce CDC y donde la CDC inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la Fc variante de IgG1 se encuentra fuertemente reducida en comparación con la CDC inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende la región Fc de la IgG1 humana de tipo salvaje.
- 30 6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD9, que se caracteriza porque la región Fc de tipo salvaje comprende como región variable de cadena pesada, SEC ID nº 9 y como región variable de cadena ligera, SEC ID nº 8.
- 35 7. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización como medicamento.
- 40 8. Anticuerpo o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la utilización en un método para el tratamiento de una enfermedad en un individuo, en el que resulta favorable que una función efectora del anticuerpo o proteína de fusión de Fc se encuentra fuertemente reducida en comparación con la función efectora inducida por el anticuerpo o proteína de fusión de Fc que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, donde el método comprende administrar el anticuerpo o proteína de fusión de Fc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el individuo.

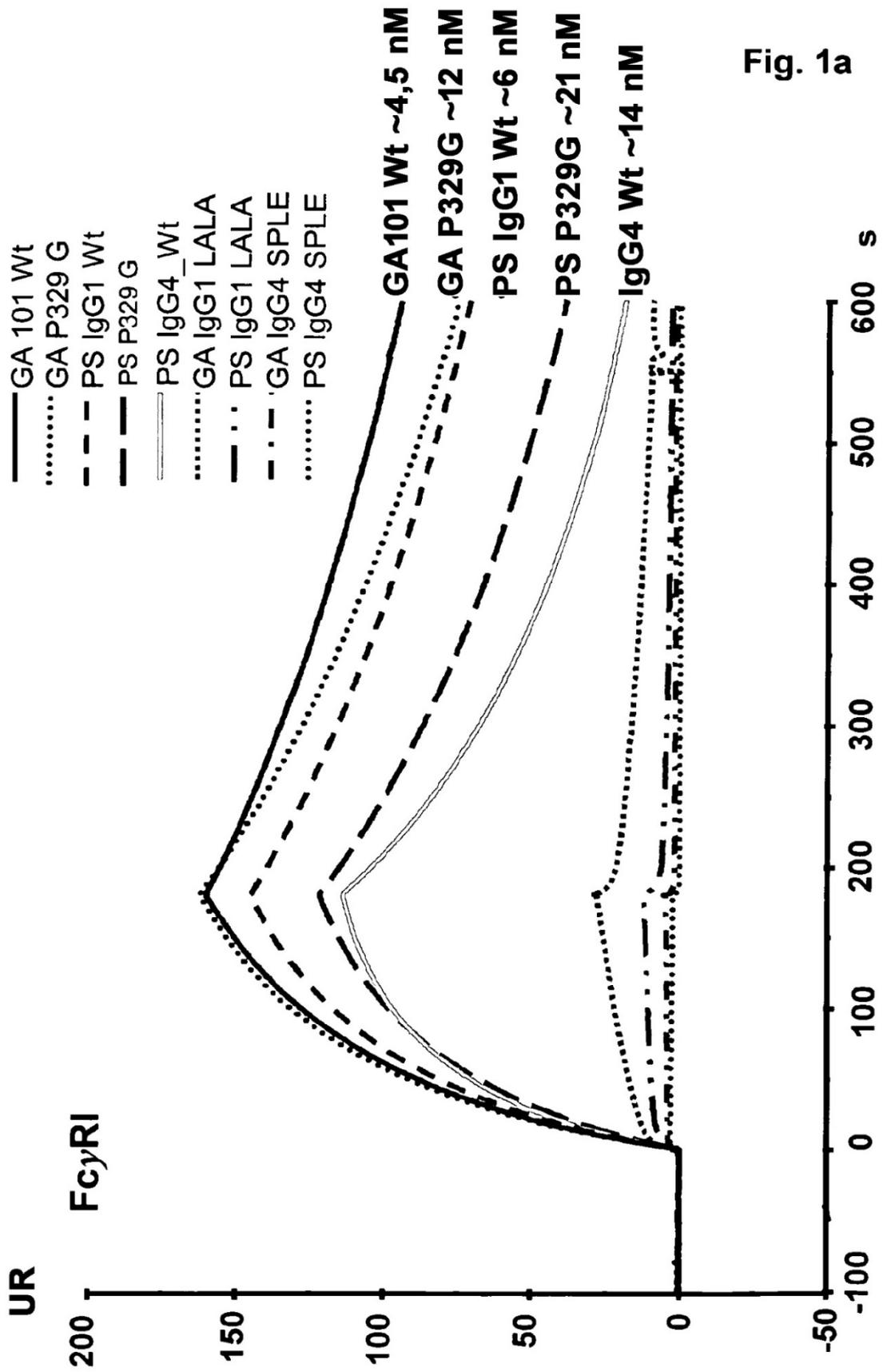
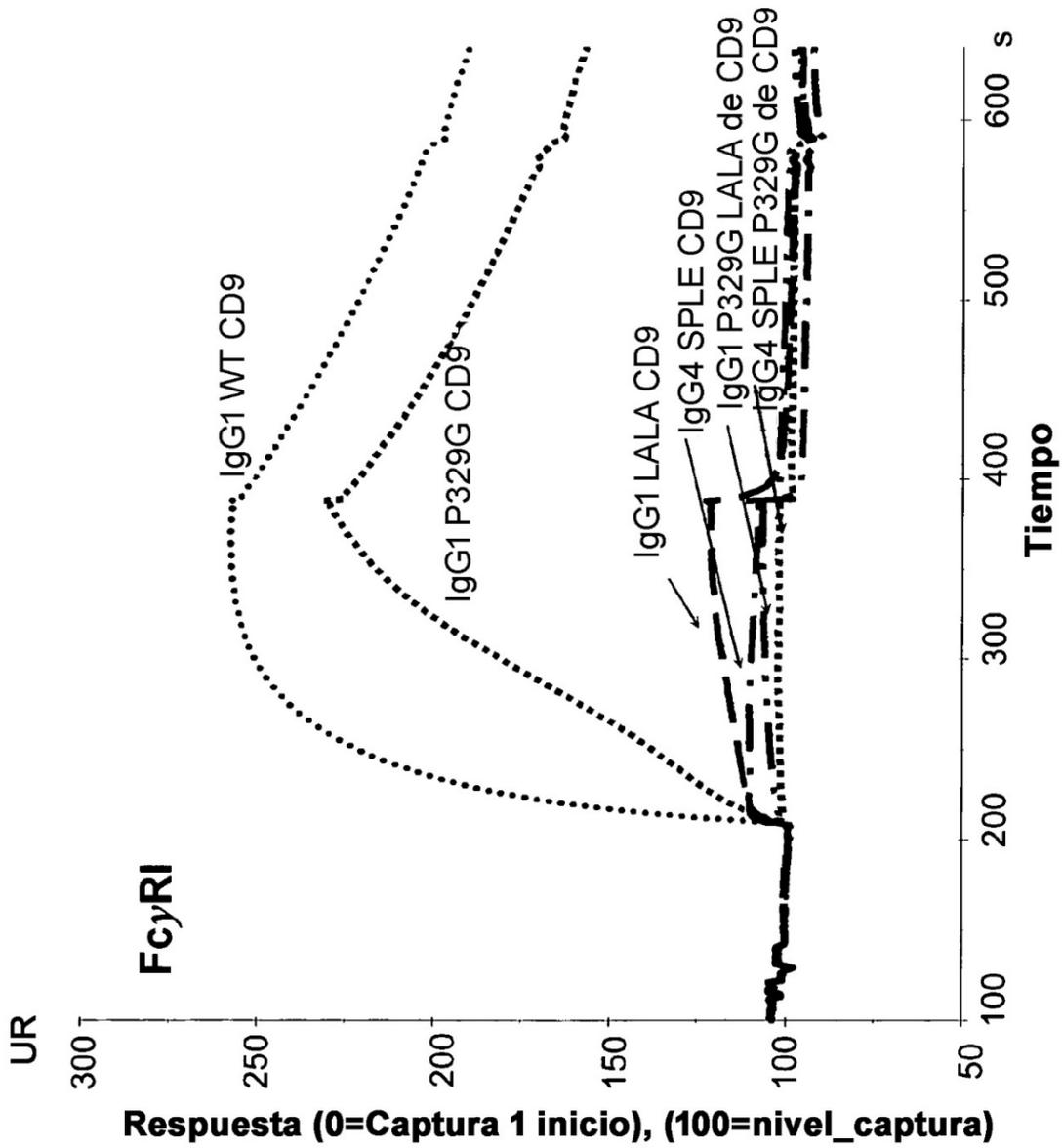


Fig. 1a

Fig. 1b



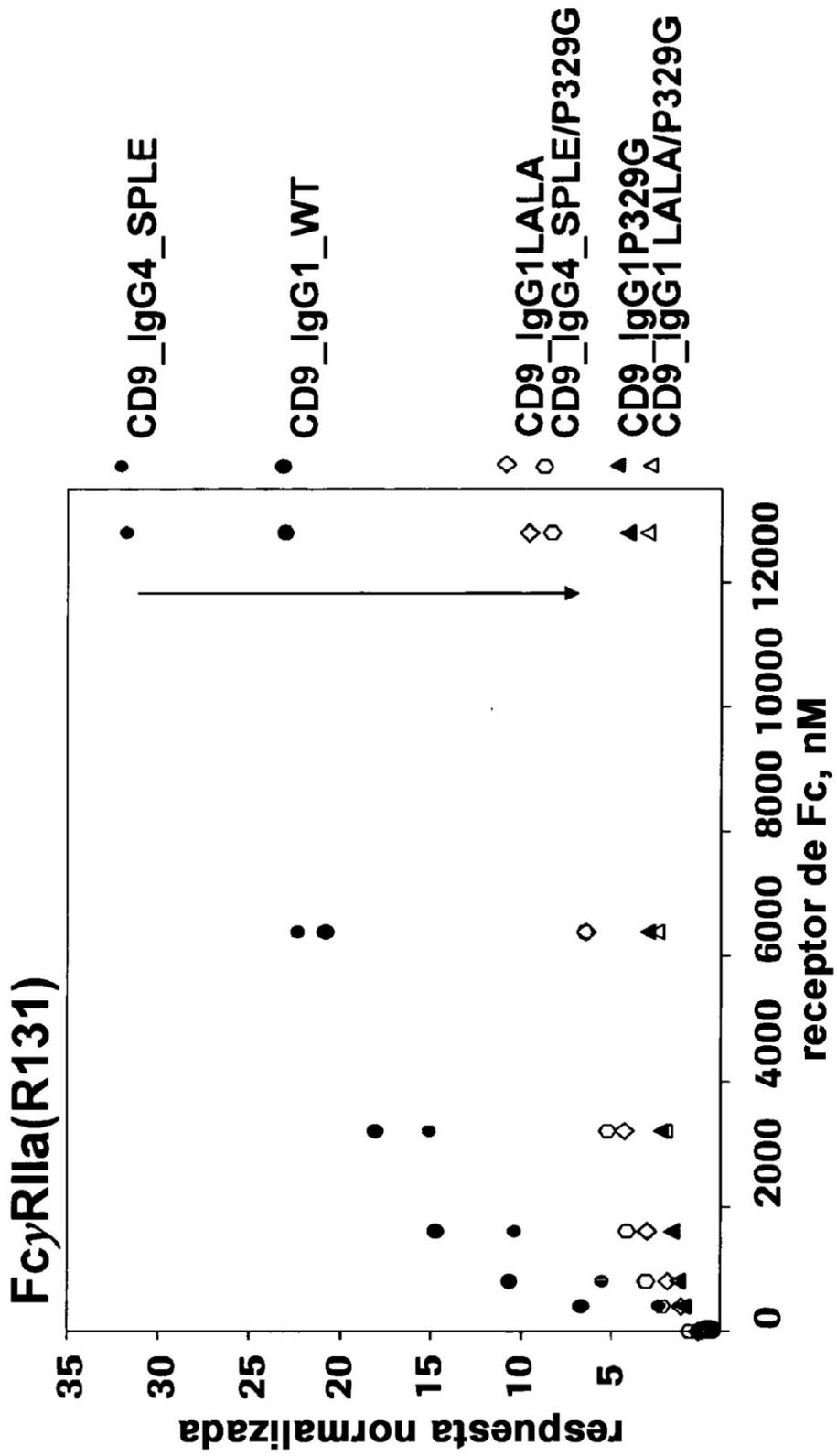
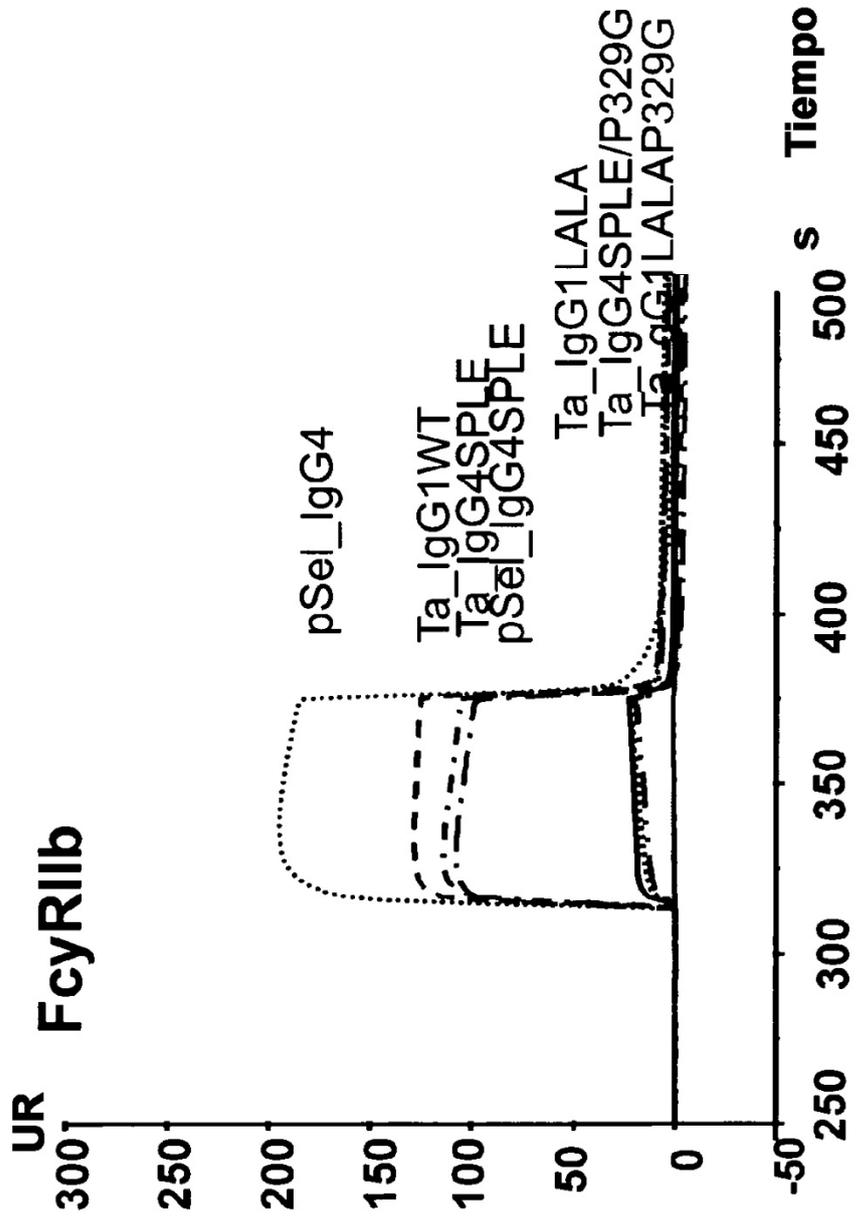


Fig. 1c

Fig. 1d



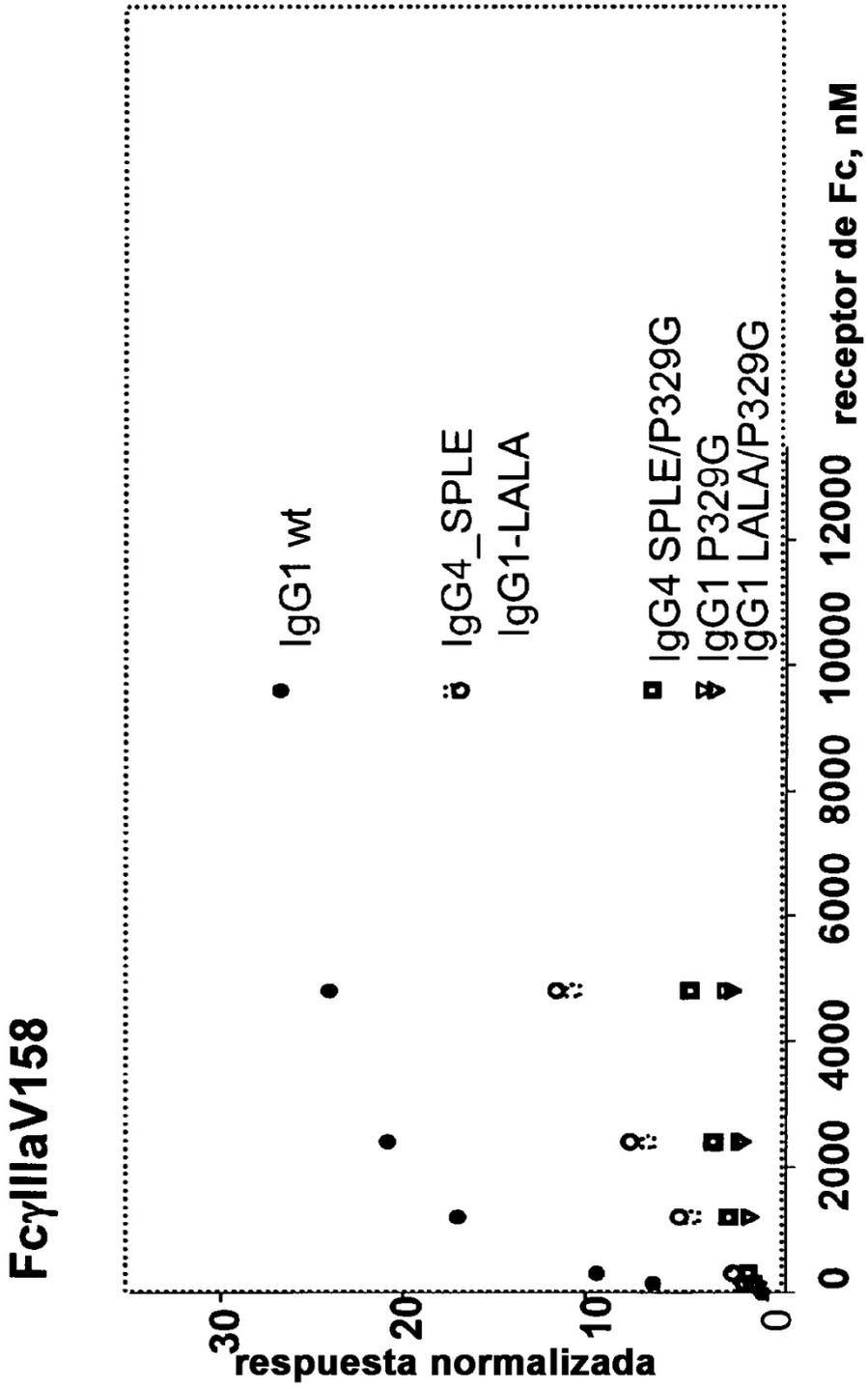
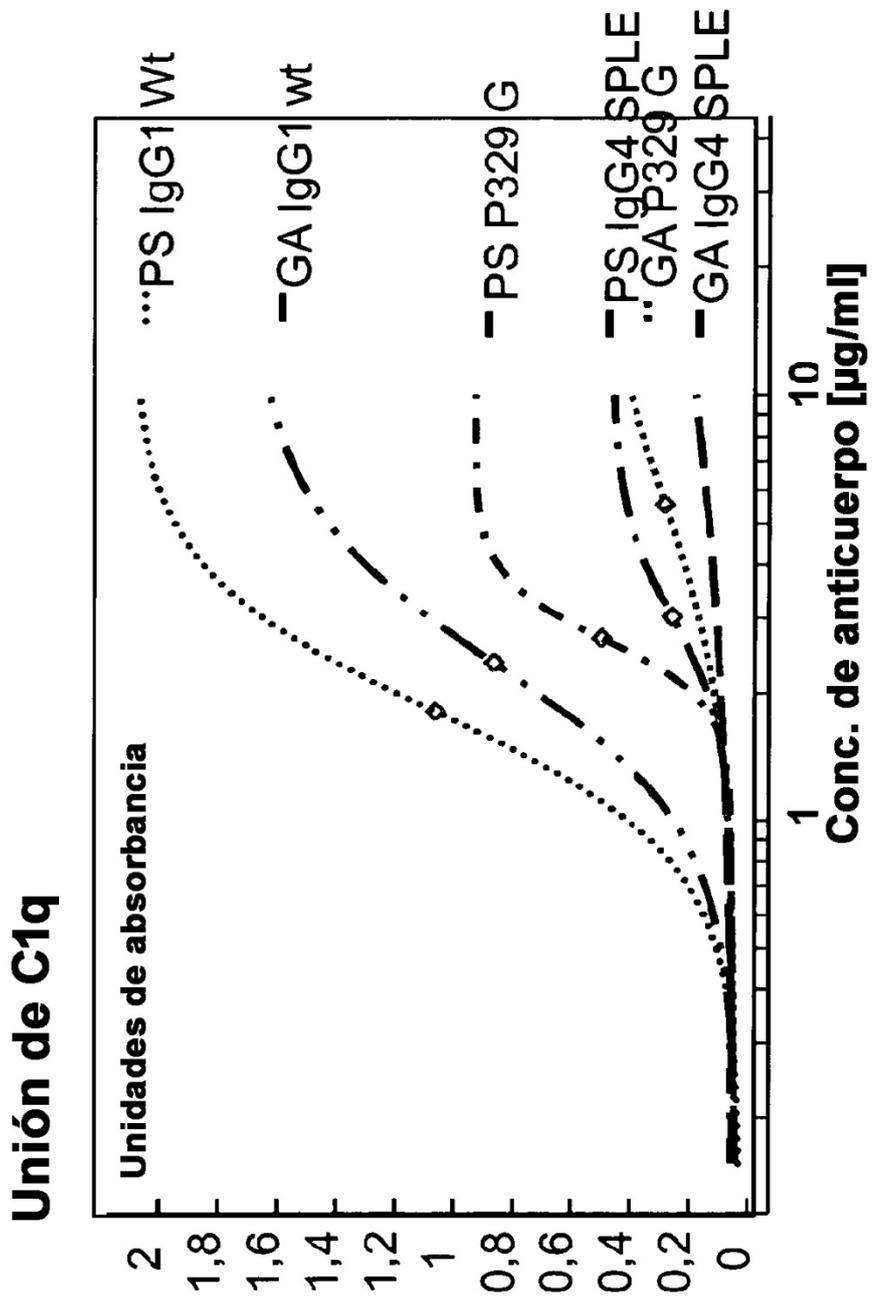


Fig. 1e

Fig. 2



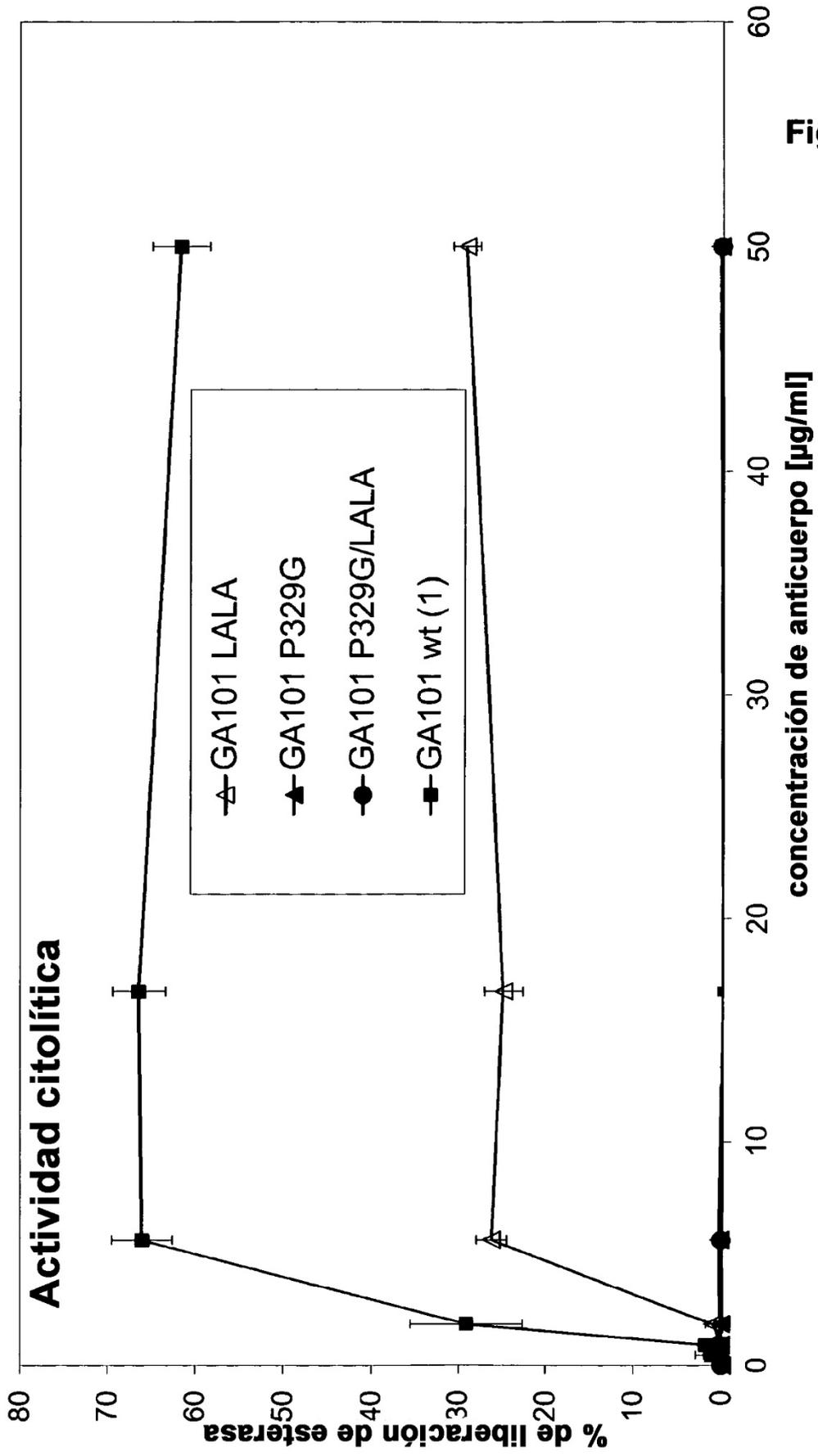


Fig. 3a

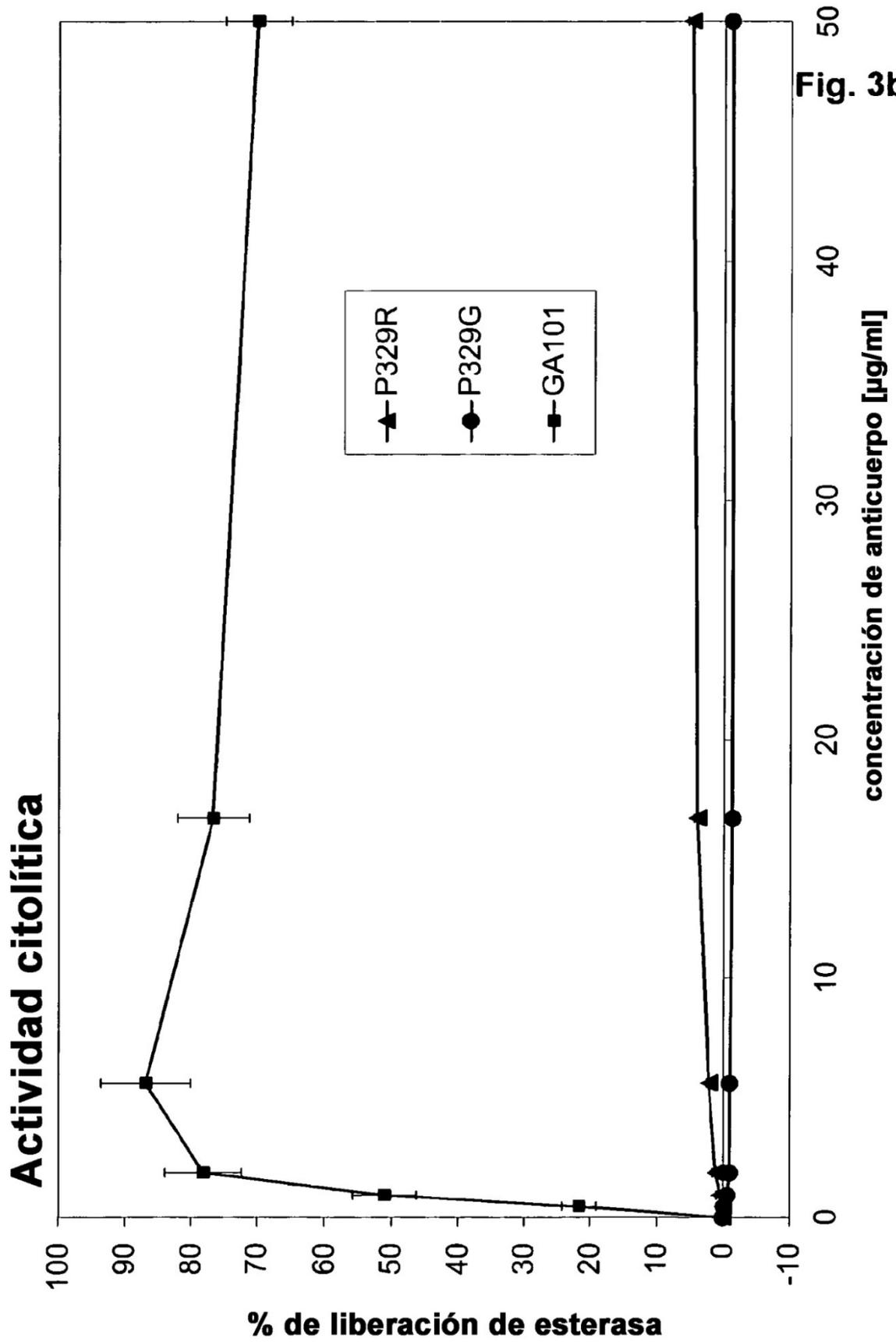


Fig. 3b

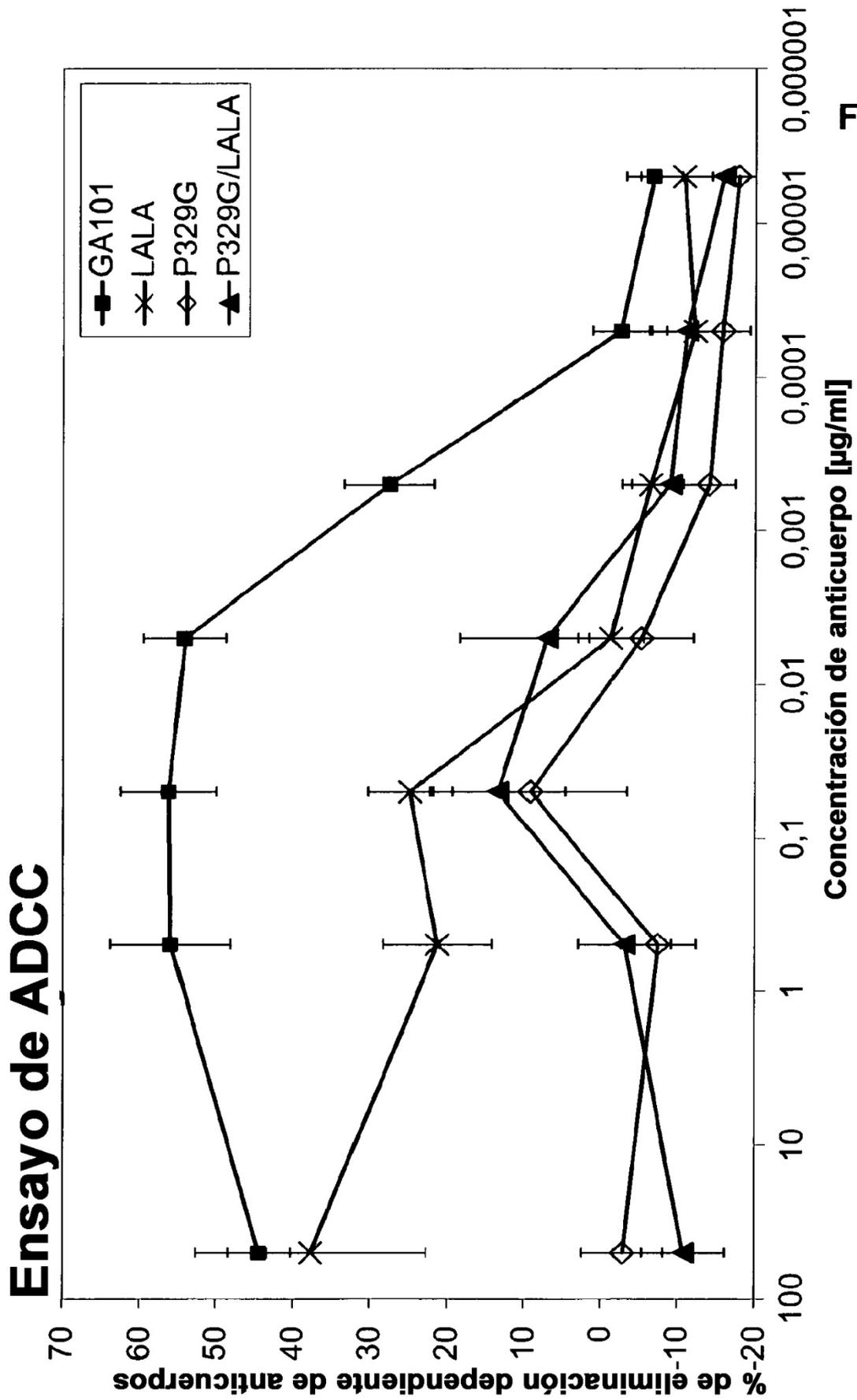


Fig. 4a

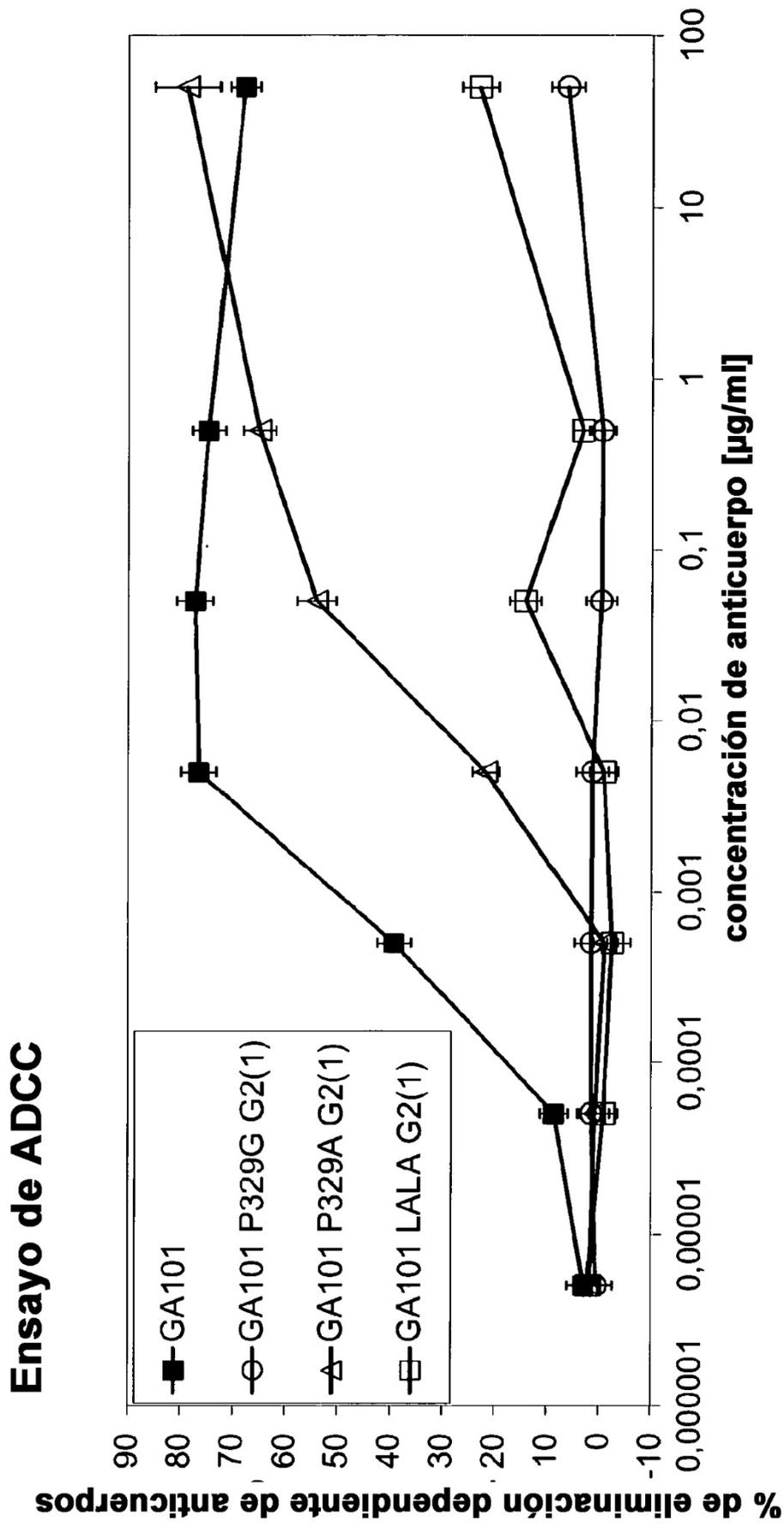


Fig. 4b

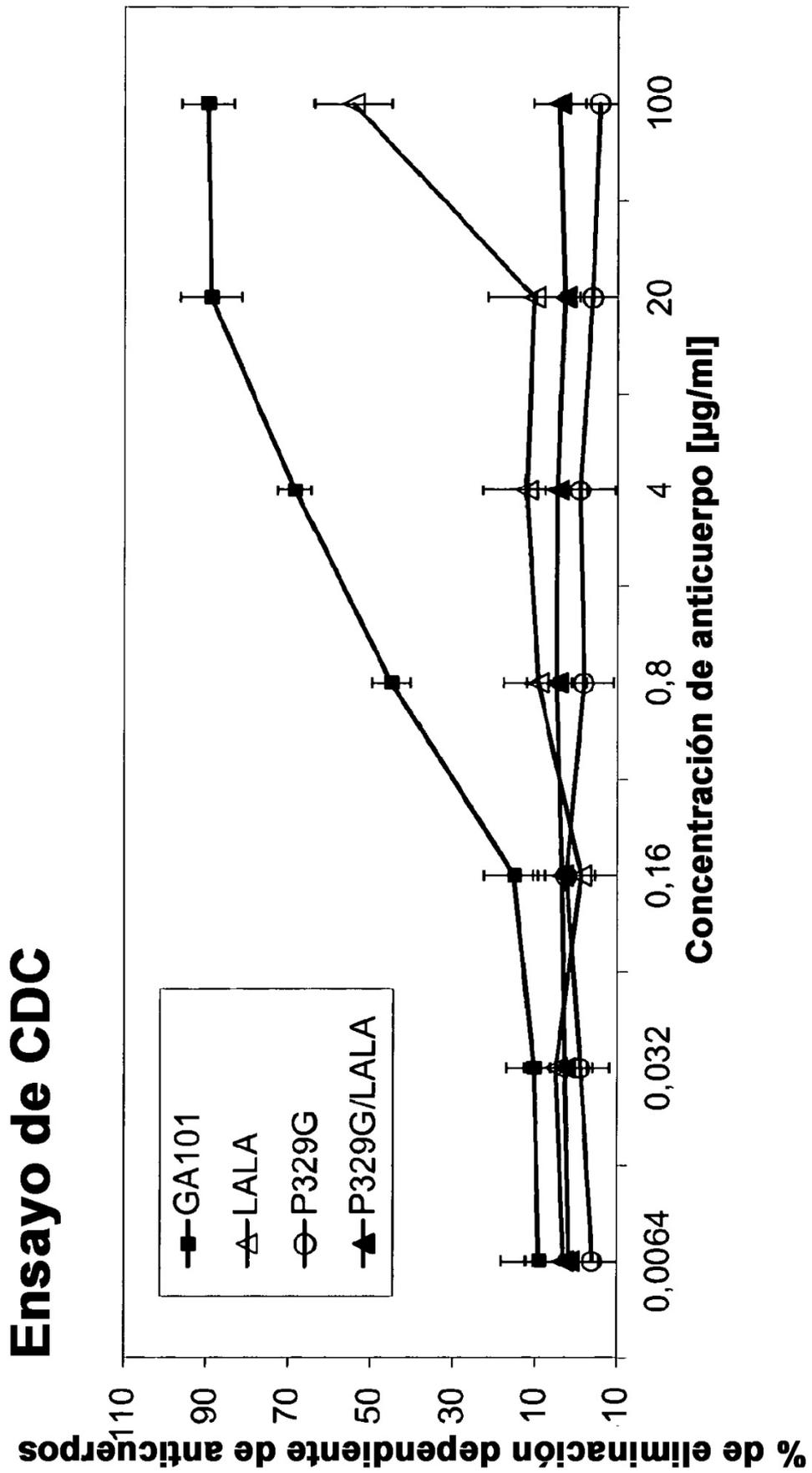


Fig. 5a

Ensayo de CDC

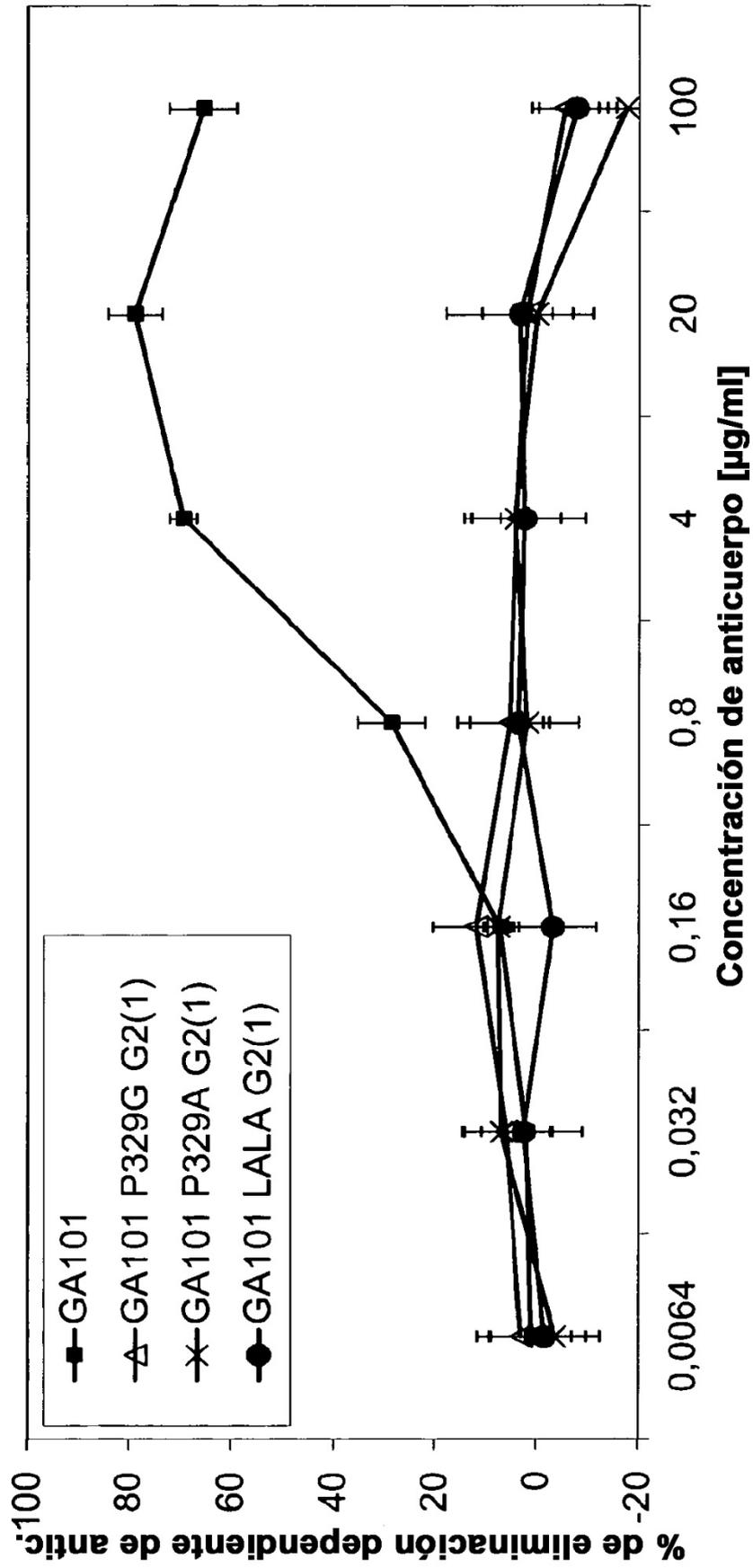


Fig. 5b

Fig. 6a

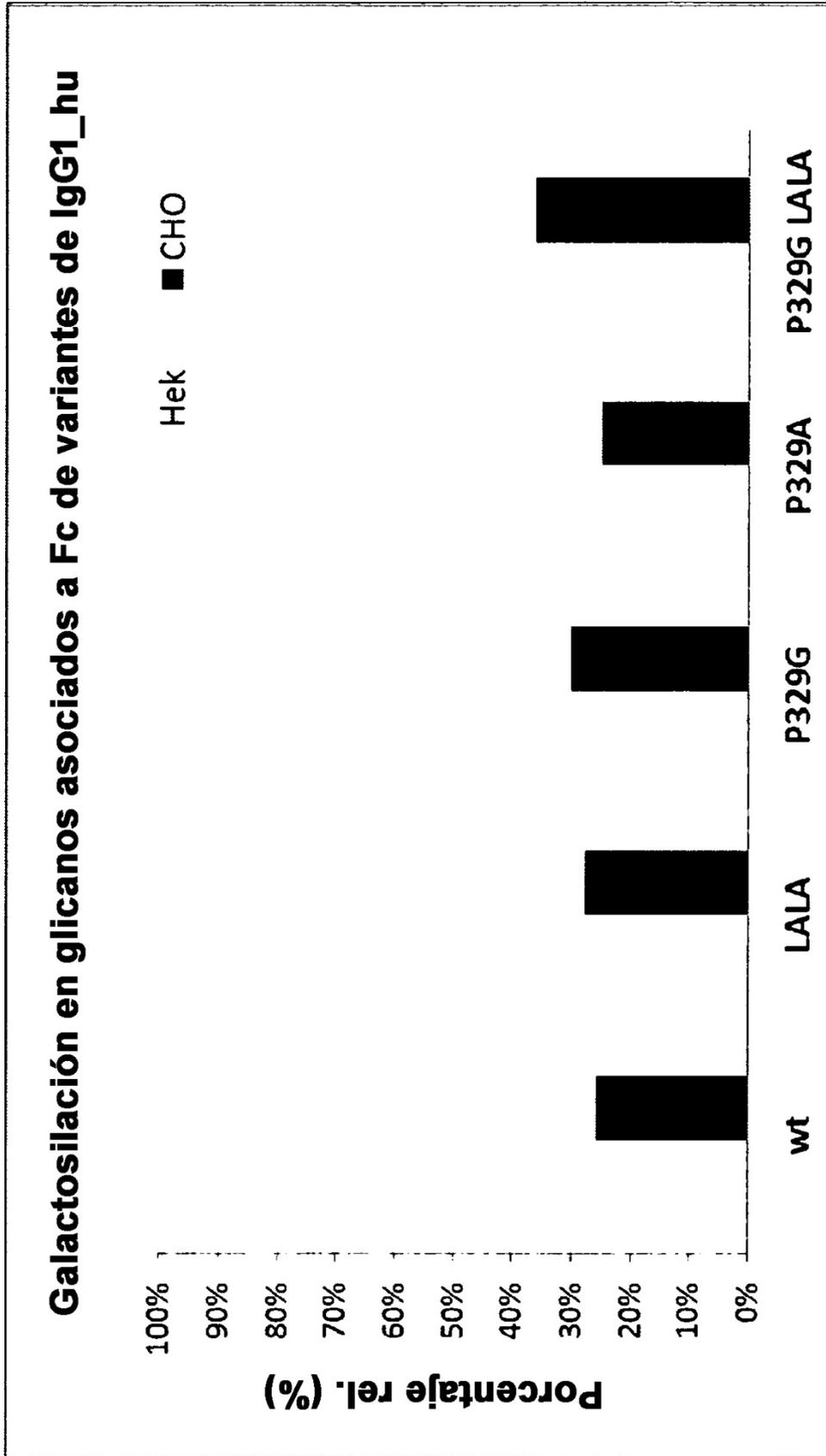
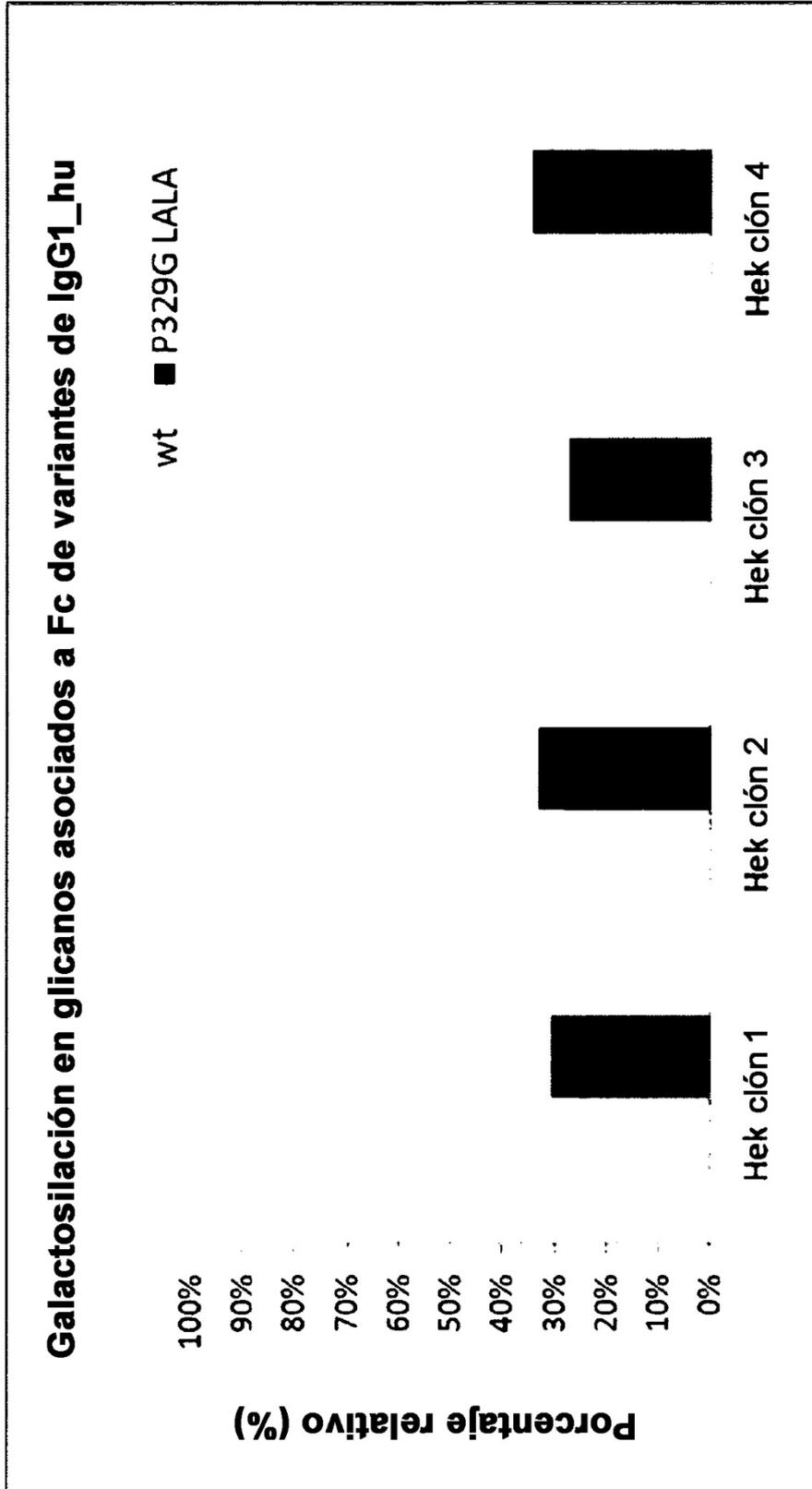


Fig. 6b



**Agregación plaquetaia inducida por anticuerpos
Donante A**

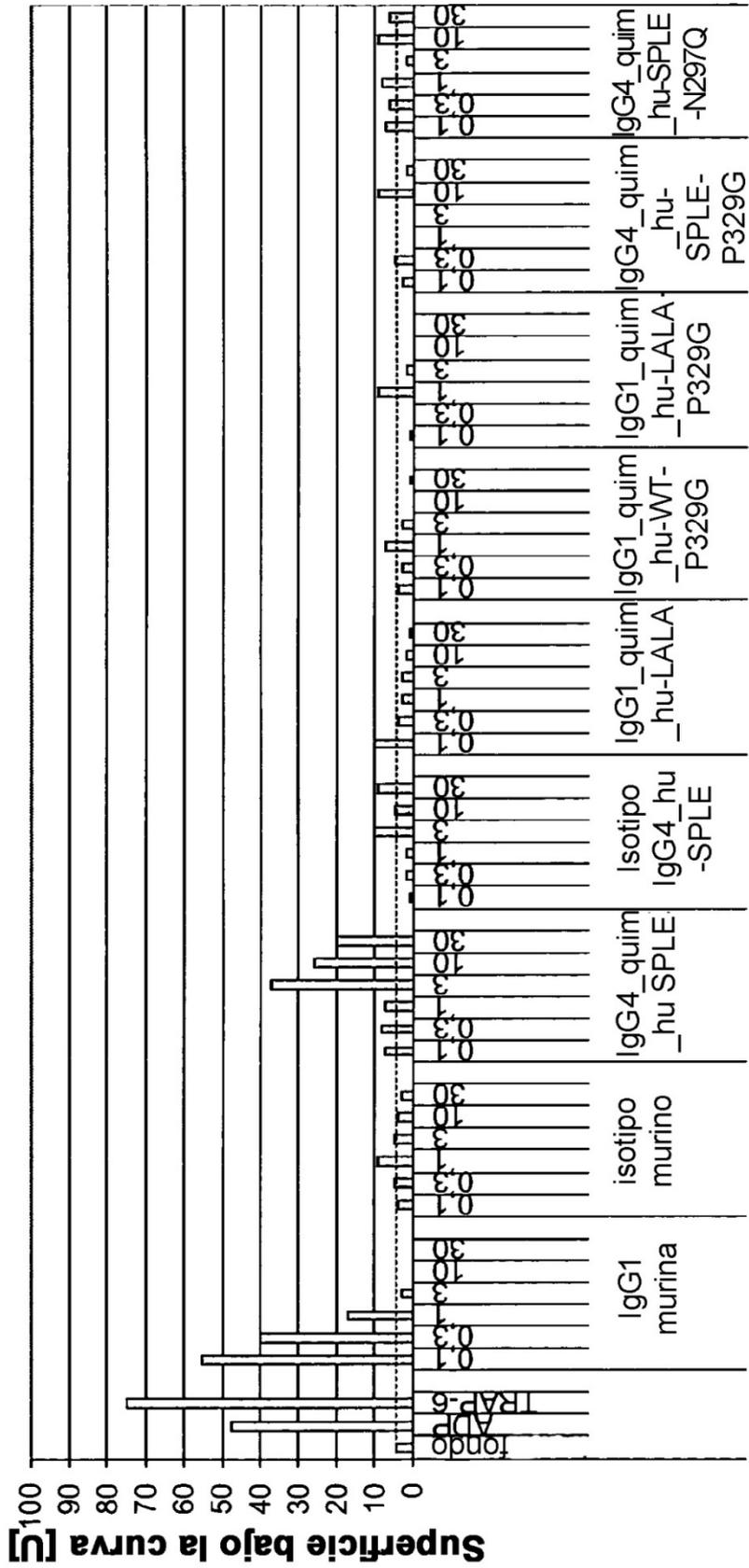


Fig. 7a

**Agregación plaquetaria inducida por anticuerpos
Donante B**

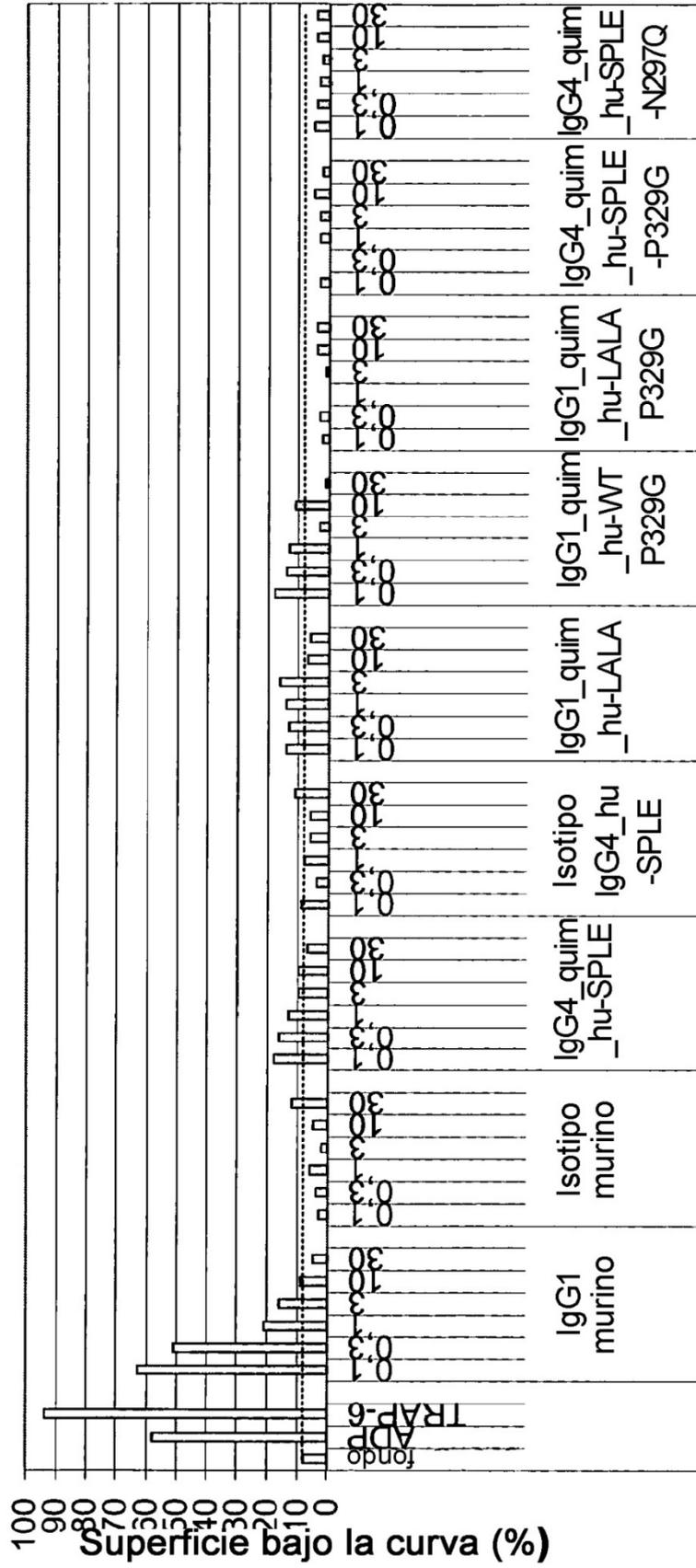


Fig. 7b