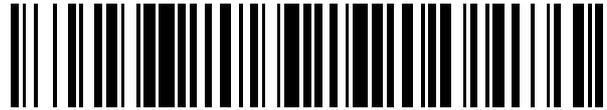


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 002**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2000 PCT/US2000/00973**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2017 WO00042072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2000 E 00906925 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 1141024**

54 Título: **Polipéptido que comprende una región Fc de IgG1 humana variante**

30 Prioridad:

15.01.1999 US 116023 P

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

17.12.2018

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080-4990 , US

72 Inventor/es:

PRESTA, LEONARD, G.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 694 002 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

Polipéptido que comprende una región Fc de IgG1 humana variante

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una región de Fc variante. Más particularmente, la presente invención se refiere a polipéptidos que contienen una región de Fc que presentan una alteración en la función efectora como consecuencia de una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

10 Los anticuerpos son proteínas que exhiben especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos nativos habitualmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada a través de un puente de disulfuro covalente, aunque el número de puentes de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también presenta puentes de disulfuro intra-cadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados residuos de aminoácido concretos forman un interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

20 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tanto en el dominio variable de la cadena ligera como en el de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FRs). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FRs, adoptando en gran parte una configuración de lámina β, conectados por tres CDRs, que forman bucles que conectan la estructura de lámina β, y en algunos casos forman parte de la misma. Las CDRs de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FRs y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos (véase Kabal *et al.*, **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)).

35 Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar los anticuerpos o las inmunoglobulinas a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de las mismas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. De las diversas clases de inmunoglobulina humana, solo se sabe que activen complemento la IgG1, IgG2, IgG3 e IgM; y la IgG1 e IgG3 median en ADCC más eficientemente que la IgG2 e IgG4.

40 En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de la estructura de la IgG1 nativa, en la que se indican varias porciones de la molécula de anticuerpo nativa. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. La estructura cristalina de la región Fc de IgG humana ha sido determinada (Deisenhofer, **Biochemistry** 20: 2361-2370 (1981)).
45 En moléculas de IgG humana, la región de Fc se genera mediante ruptura con papaína N-terminal al Cys 226. La región Fc es fundamental para las funciones efectoras de los anticuerpos.

Las funciones efectoras mediadas por la región Fc del anticuerpo se pueden dividir en dos categorías: (1) funciones efectoras que actúan tras la unión del anticuerpo a un antígeno (estas funciones implican la participación de la cascada de complemento o de células portadoras de receptor de Fc (FcR)); y (2) funciones efectoras que actúan independientemente de la unión a antígeno (estas funciones confieren persistencia en la circulación y la capacidad de ser transferidas a través de barreras celulares mediante transcitosis). Ward y Ghetie, **Therapeutic Immunology** 2: 77-94 (1995).

55 Aunque la unión de un anticuerpo al antígeno requerido tiene un efecto neutralizante que podría evitar la unión de un antígeno extraño a su diana endógena (p.ej., receptor o ligando), la unión por sí solo puede no eliminar el antígeno extraño. Para ser eficaz en la eliminación y/o destrucción de antígenos extraños, un anticuerpo debería estar dotado de una elevada afinidad de unión a su antígeno, y de funciones efectoras eficientes.

Unión a receptor de Fc (FcR)

La interacción de anticuerpos y complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmune produce una variedad de respuestas, que incluyen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (revisado en Daëron, **Annu. Rev. Immunol.** 15: 203-234 (1997); Ward y Ghetie, **Therapeutic Immunol.** 2: 77-94 (1995); así como Ravetch y Kinet, **Annu. Rev. Immunol.** 9: 457-492 (1991)).

Varias funciones efectoras de anticuerpo están mediadas por receptores de Fc (FcRs), que se unen a la región de Fc de un anticuerpo. Los FcRs se definen por su especificidad por los isotipos de inmunoglobulina; los receptores de Fc para anticuerpos de IgG se denominan FcγR, para IgE FcεR, para IgA FcαR, etc. Se han identificado tres subclases de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Puesto que cada subclase de FcγR está codificada por dos o tres genes, y la división de ARN alternativa conduce a múltiples transcritos, existe una amplia diversidad de isoformas de FcγR. Los tres genes que codifican la subclase FcγRI (FcγRIA, FcγRIB y FcγRIC) están agrupados en la región 1q21.1 del brazo largo del cromosoma 1; los genes que codifican las isoformas FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC) y los dos genes que codifican FcγRIII (FcγRIIIA y FcγRIIIB) están todos agrupados en la región 1q22. Estos subtipos de FcR diferentes se expresan sobre tipos de células diferentes (revisado en Ravetch y Kinet, **Annu. Rev. Immunol.** 9: 457-492 (1991)). Por ejemplo, en humanos, FcγRIIIB solo se observa en neutrófilos, mientras que FcγRIIIA aparece en macrófagos, monocitos, células asesinas naturales (NK), y en una subpoblación de células T. Cabe destacar que FcγRIIIA es el único FcR presente en células NK, uno de los tipos celulares implicados en ADCC.

FcγRI, FcγRII y FcγRIII son receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF); FcγRI presenta tres dominios de IgSF en su dominio extracelular, mientras que FcγRII y FcγRIII presentan solo dos dominios de IgSF en sus dominios extracelulares.

Otro tipo de receptor de Fc es el receptor de Fc neonatal (FcRn). El FcRn es similar estructuralmente al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y consiste en una cadena α unida no covalentemente a microglobulina β2.

El sitio de unión en los anticuerpos humanos y murinos para FcγR ha sido mapeado previamente en la denominada "región de bisagra inferior" que consiste en los residuos 233-239 (numeración de índice EU según Kabat et al., **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Wood et al. **Molec. Immunol.** 23: 319-330 (1986); Duncan et al. **Nature** 332:563 (1988); Canfield y Morrison, **J. Exp. Med.** 173: 1483-1491 (1991); Chappel et al., **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 88: 9036-9040 (1991). De los residuos 233-239, el P238 y el S239 han sido citados como posibles participantes en la unión, pero estos dos residuos nunca han sido evaluados en términos de sustitución o eliminación.

Otras áreas citadas previamente posiblemente implicadas en la unión a FcγR son: G316-K338 (IgG humana) para FcγRI humano (solo por comparación de secuencia; no se evaluaron mutantes de sustitución) (Woof et al. **Molec. Immunol.** 23: 319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 humana) para FcγRIII humano (basada en péptidos) (Sarmay et al., **Molec. Immunol.** 21: 43-51 (1984)); Y407-R416 (IgG humana) para FcγRIII humano (basada en péptidos) (Gergely et al. **Biochem. Soc. Trans.** 12: 739-743 (1984)); así como N297 y E318 (IgG2b murina) para FcγRII murino (Lund et al., **Molec. Immunol.**, 29:53-59 (1992)).

El residuo Pro331 en IgG3 se cambió a Ser, y se analizó la afinidad de esta variante por las células diana. Se observó que la afinidad era seis veces inferior a la de IgG3 no mutada, lo que indica la participación del Pro331 en la unión a FcγRI. Morrison et al., **Immunologist**, 2: 119-124 (1994); y Canfield y Morrison, **J. Exp. Med.** 173: 1483-91 (1991).

Unión de C1q

C1q y dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la ruta de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q es una molécula hexavalente con un peso molecular de aproximadamente 460.000 y una estructura que se asemeja a un ramillete de tulipanes en la que seis "tallos" colagenosos están conectados a seis regiones de cabeza globular. Burton y Woof, **Advances in Immunol.** 51: 1-84 (1992). Para activar la cascada de complemento, es necesario que el C1q se una a al menos dos moléculas de IgG1, IgG2 o IgG3 (el consenso es que IgG4 no activa complemento), pero solo a una molécula de IgM, unida a la diana antigénica. Ward y Ghetie, **Therapeutic Immunology** 2: 77-94 (1995) en la página 80.

En base a los resultados de modificaciones químicas y estudios cristalográficos, Burton et al. (**Nature**, 288: 338-344 (1980)) propusieron que el sitio de unión para el subcomponente de complemento C1q en IgG implica al menos dos cadenas-β (C-terminales) del dominio CH2. Burton sugirió más tarde (**Molec. Immunol.**, 22(3): 161-206 (1985)) que la región que comprende los residuos de aminoácido 318 a 337 podría estar implicada en la fijación de complemento.

Duncan y Winter (**Nature** 332: 738-40 (1988)), usando mutagénesis sitodirigida, publicaron que los residuos Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión a C1q. Los datos de Duncan y Winter fueron generados evaluando la unión a un isotipo IgG2b de ratón a C1q de cobaya. Se confirmó el papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys322 en la

unión de C1q a través de la capacidad de un péptido sintético corto que contenía dichos residuos para inhibir la lisis mediada por complemento. Se describen resultados similares en la Patente de EE.UU. nº 5.648.260, emitida el 15 de julio de 1997, y en la Patente de EE.UU. nº 5.624.821 emitida el 29 de abril de 1997.

5 El residuo Pro331 ha sido implicado en la unión a C1q mediante el análisis de la capacidad de subclases de IgG humana para llevar a cabo la lisis celular mediada por complemento. La mutación de Ser331 a Pro331 en IgG4 confirió la capacidad de activar complemento. (Tao et al., *J. Exp. Med.*, 178: 661-667 (1993); Brekke et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 2542-47 (1994)).

10 A partir de la comparación de los datos del grupo de Winter, y de los artículos de Tao et al. y Brekke et al., Ward y Ghetie concluyeron en su artículo de revisión que existen al menos dos regiones diferentes implicadas en la unión de C1q: una sobre la cadena β del dominio CH2 que porta los residuos Glu318, Lys320 y Lys322, y la otra a su vez localizada en estrecha proximidad a la misma cadena β , y que contiene un residuo de aminoácido clave en la posición 331.

15 Otros informes sugirieron que los residuos de IgG1 humana Leu235 y Gly237, localizados en la región de bisagra inferior, desempeñan una función crítica en la fijación y activación de complemento. Xu et al., *Immunol.* 150: 152A (Resumen) (1993). El documento WO94/29351, publicado el 22 de diciembre de 1994, indica que los residuos de aminoácido necesarios para la unión de C1q y FcR de IgG1 humana están localizados en la región N-terminal del dominio CH2, es decir, los residuos 231 a 238.

20 Se ha propuesto adicionalmente que la capacidad de la IgG para unirse a C1q y activar la cascada de complemento también depende de la presencia, ausencia o modificación del resto de carbohidrato posicionado entre los dos dominios de CH2 (que normalmente está anclado en Asn297). Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2: 77-94 (1995) en la página 81.

25 El documento US-A-5624821 se refiere a anticuerpos con funciones efectoras alteradas y evalúa la unión de mutantes de IgG2b murina y de IgG3 a Fc γ RI humano. Los mutantes Ala234, Glu235, Ala236 y Ala237 presentaron una afinidad reducida por Fc γ RI en comparación con el anticuerpo natural (original). Adicionalmente, los mutantes de IgG2b murinos son evaluados para determinar la unión a C1q. Los mutantes Glu318Ala, Lys320Ala y Lys322Ala presentaron una afinidad drásticamente reducida por C1q.

El documento WO 98/23289 se refiere a moléculas de IgG mutante que presentan secuencias de aminoácido alteradas en la región de unión a FcRn y propone mutaciones en las regiones de IgG de ratón y de IgY de pollo para la unión a FcRn.

30 Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15: 637-640 (1997) trata sobre la afinidad creciente de un fragmento de Fc γ 1 murino para la unión a FcRn murino mediante mutagénesis aleatoria de Thr252, Thr254 y Thr256.

Medesan et al., *Eur. J. Immunol.*, 28: 2092-2100 (1998) describe fragmentos de bisagra de Fc de rata mutados y estudia la interacción de IgG de rata con FcRn de rata.

35 Henry et al., *Biochemistry*, 36: 15568-15578 (1997) han investigado la implicación de residuos concretos en el dominio C ϵ 3 de IgE en su interacción con Fc ϵ RI.

40 Sarmay et al., *Mol. Immunol.* mayo de 1992; 29(5): 633-9 informa sobre anticuerpos específicos de 3-iodo-4-hidroxi-5-nitrofenacetilo (NIP) que fueron comparados en términos de inducción de lisis dependiente de anticuerpos de glóbulos rojos derivatizados con NIP efectuada mediante células pre-estimuladas U937 o HL-60 y mediante células K. Los anticuerpos quiméricos presentan cadenas pesadas que corresponden a las subclases de IgG humana 1-4, e incluyen mutantes sito-dirigidos de IgG3, así como la forma aglicosilada de IgG3; también se examinó un anticuerpo de IgG2b de ratón y una IgG2b mutante sito-dirigida. Las células U937 o HL-60 estimuladas con rIFN expresan niveles incrementados de Fc gamma R1 en comparación con las células no estimuladas; las células HL-60 y U937 estimuladas con PMA expresan un nivel incrementado de Fc gamma R11 en comparación con las células no estimuladas, y las células K expresan Fc gamma R111.

45 El documento WO 99/51642 (publicado el 14.10.1999) describe variantes de anticuerpo que presentan una función efectora alterada y que comprenden una región de Fc de IgG humana que presenta una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 o 334.

Sumario de la invención

50 La presente invención proporciona una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc de IgG1 humana variante como se define en las reivindicaciones 1-8. El polipéptido variante puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo o una inmunoadhesina. La región Fc del polipéptido original preferiblemente comprende una región Fc humana; p.ej., una región de Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. El polipéptido variante preferiblemente comprende una modificación de aminoácido (p.ej., una sustitución) en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los
55 residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

Adicionalmente, la invención proporciona un polipéptido que comprende una región Fc de IgG humana variante con una afinidad de unión a receptor gamma de Fc (FcγR) alterada, polipéptido que comprende una modificación de aminoácido en uno cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 324, 326, 327, 330, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 313, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat. La región Fc de IgG humana variante es, p.ej. una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana variante. En relación a esto, cabe destacar que en el trabajo de la técnica citada anteriormente donde el polipéptido tenía una región Fc murina no humana, se pensaba que residuos diferentes a los identificados en la presente memoria tenían un impacto sobre la unión a FcR. Por ejemplo, en el sistema FcγRII murino/IgG2b murina, se observó que el E318 de IgG era importante para la unión (Lund et al. *Molec. Immunol.* 27(1): 53-59 (1992)), mientras que el residuo E318A no presentaba efecto en el sistema FcγRII humano/IgG humana (ver Tabla 6 más adelante).

En una realización, el polipéptido variante con actividad de unión a FcγRI alterada presenta una unión reducida a un FcγR y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

Por ejemplo, el polipéptido variante puede presentar una unión reducida a un FcγRI y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 238, 265, 269, 270 o 327 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

El polipéptido variante puede presentar una unión reducida a un FcγRII y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

El polipéptido variante de interés puede presentar una unión reducida a un FcγRIII y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 265, 288, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 327, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

En otra realización, el polipéptido variante con una afinidad de unión a FcγR alterada presenta una unión mejorada al FcγR y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

Por ejemplo, el polipéptido variante puede presentar una unión incrementada a un FcγRIII y, opcionalmente, puede presentar además una unión reducida a un FcγRII. Un ejemplo de dicha variante comprende una(s) modificación(es) de aminoácido en la(s) posición(es) 298 y/o 333 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

El polipéptido variante puede presentar una unión incrementada a un FcγRII y comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 337, 340, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat. Dichos polipéptidos variantes con unión incrementada a un FcγRII pueden presentar opcionalmente una unión reducida a un FcγRIII y pueden, por ejemplo, comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 268, 272, 298, 301 o 340 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

La invención proporciona además un polipéptido que comprende una región Fc variante con una afinidad de unión a receptor de Fc neonatal (FcRn) alterada, polipéptido que comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 253, 255, 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 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat. Dichos polipéptidos variantes con unión reducida a un FcRn pueden comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447 de la región Fc, donde la numeración del residuo en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat. Los polipéptidos mencionados anteriormente, alternativamente, presentan una unión incrementada a FcRn y comprenden una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de la región Fc, donde la numeración de los residuos en la región Fc corresponde al índice EU de Kabat.

La invención también proporciona una composición que comprende el polipéptido variante y un vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable. Dicha composición para potencial uso terapéutico es estéril y puede ser liofilizada.

5 Los polipéptidos variantes descritos en la presente memoria son adecuados para usos diagnósticos y terapéuticos. En una aplicación diagnóstica, un método para determinar la presencia de un antígeno de interés comprende exponer una muestra que se sospecha que contiene el antígeno al polipéptido variante y determinar la unión del polipéptido variante a la muestra. En una aplicación terapéutica, el tratamiento de un mamífero que padece o que tiene predisposición a una enfermedad o trastorno, comprende la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido variante como el descrito en la presente memoria, o de una composición
10 que comprende el polipéptido variante y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además: un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido variante; un vector que comprende el ácido nucleico, opcionalmente, ligado operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula hospedante transformada con el vector; una célula hospedante que contiene al vector; un método para producir el polipéptido variante que comprende cultivar dicha célula hospedante de tal modo que el ácido nucleico sea expresado y, opcionalmente, recuperar el polipéptido variante del cultivo de célula hospedante (p.ej., del medio de cultivo de célula hospedante).
15

La invención proporciona además un método para fabricar una región Fc variante con afinidad de unión mejorada a receptor III de Fc γ (Fc γ RIII), o una actividad de citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) mejorada, que comprende:

20 (a) Introducir una o más modificaciones de aminoácido en una región Fc de un polipéptido original a fin de generar una región Fc variante;

(b) Identificar una región Fc variante con afinidad de unión a Fc γ RIII mejorada, o con una actividad de ADCC mejorada.

La invención trata adicionalmente sobre un método para fabricar una región Fc variante tal como se define en las reivindicaciones.
25

Breve descripción de las figuras

Figura 1: es una representación esquemática de una IgG nativa. Los puentes de disulfuro se representan mediante líneas gruesas entre los dominios CH1 y CL y los dos dominios CH2. V es dominio variable; C es dominio constante; L significa cadena ligera y H significa cadena pesada.

30 Figura 2: muestra la unión a C1q de anticuerpo C2B8 natural (wt, del inglés "wild-type"); anticuerpo C2B8 con una región constante de IgG2 humana (IgG2); y las variantes K322A, K320A y E318A.

Figura 3: muestra la unión a C1q de las variantes P331A, P329A y K322A.

Figuras 4A y 4B: muestran las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-IgE E27, cadena ligera (Fig. 4A; SEQ ID NO:1) y cadena pesada (Fig. 4B; SEQ ID NO:2).

35 Figura 5: es un diagrama esquemático del "complejo inmune" preparado para uso en el ensayo de FcR descrito en el Ejemplo 1. Se muestra el hexámero que comprende tres moléculas de anticuerpo anti-IgE (el "polipéptido que contiene región Fc") y tres moléculas de IgE (la "primera molécula diana"). IgE tiene dos "sitios de unión" para el anticuerpo anti-IgE (E27) en la región Fc del mismo. Cada molécula de IgE del complejo es capaz además de unirse a dos moléculas de VEGF ("el segundo polipéptido diana"). VEGF tiene dos "sitios de unión" para IgE.

40 Figura 6: muestra los resultados de unión a C1q obtenidos para las variantes D270K y D270V en comparación con C2B8 natural.

Figura 7: muestra la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) de las variantes D270K y D270V, en comparación con C2B8 natural.

45 Figura 8: muestra los resultados de ELISA de unión a C1q para anticuerpo C2B8 natural producido en células 293 (293-Wt-C2B8), anticuerpo C2B8 natural producido en CHO (CHO-Wt-C2B8) y varios anticuerpos variantes.

Figura 9: muestra los resultados de ELISA de unión a C1q obtenidos para C2B8 natural (wt) y varios anticuerpos variantes determinados en el Ejemplo 3.

Figura 10: muestra la estructura tridimensional de una región Fc de IgG humana, destacando los residuos: Asp270, Lys326, Pro329, Pro331, Lys322 y Glu333.

50 Figura 11: muestra los resultados de ELISA de unión a C1q obtenidos para C2B8 natural y varios anticuerpos variantes determinados en el Ejemplo 3.

Figura 12: muestra los resultados ELISA de unión a C1q obtenidos para C2B8 natural y variantes dobles, K326M-E333S y K326A-E333A.

Figura 13: muestra la CDC de C2B8 natural y de variantes dobles, K326M-E333S y K326A-E333A.

5 Figura 14: muestra los resultados ELISA de unión a C1q obtenidos para C2B8 con una IgG4 humana (IgG4), C2B8 natural (Wt-C2B8), C2B8 con una región constante de IgG2 humana (IgG2), y los anticuerpos variantes descritos en el Ejemplo 3.

Figuras 15A y 15B: muestra modelos de unión de anticuerpo original (E27) a FcγRIIB y FcγRIIIA. La Figura 15A muestra el modelo de unión para la IgG1 de E27 anti-IgE humanizada como monómero (círculos huecos), hexámero (cuadrados rellenos), y complejo inmune que consiste en hexámeros múltiples (triángulos rellenos) a una proteína de fusión GST de la subunidad α de receptor FcγRIIB (CD32). El complejo hexamérico (cuadrados rellenos) se formó mediante la mezcla de concentraciones molares iguales de E27 (que se une a la región Fc de IgE humana) y una IgE de mieloma humano. El hexámero es un complejo estable de 1,1 kD que consiste en 3 moléculas de IgG (de 150 kD cada una) y 3 moléculas de IgE (de 200 kD cada una). El complejo inmune (triángulos rellenos) se formó secuencialmente mezclando en primer lugar concentraciones equimolares de E27 y de IgE anti-VEGF recombinante (IgE humana con dominios variables de Fab que se unen a VEGF humano) para formar el hexámero. A continuación los hexámeros fueron unidos para formar un complejo inmune mediante la adición de 2x concentración molar de VEGF humano, un homodímero de 44 kD que tiene dos sitios de unión para la IgE anti-VEGF por mol de VEGF. La Figura 15B muestra el modelo de unión a una proteína de fusión GST recombinante de la subunidad α de receptor FcγRIIIA (CD16).

20 Figura 16A: muestra la unión de complejos inmunes usando diferentes pares antígeno-anticuerpo a proteína de fusión GST recombinante de la subunidad α de receptor FcγRIIA. La Figura 16B muestra la unión de los mismos pares antígeno-anticuerpo a la proteína de fusión GST de la subunidad α de receptor FcγRIIIA. Los círculos rellenos representan la unión de IgE humana:IgG1 E27 anti-IgE; los círculos huecos representan la unión de VEGF humano:IgG1 anti-VEGF humanizada.

25 Figura 17: resume las diferencias en selectividad de unión de algunas variantes de alanina entre los diferentes FcγRs. Se muestra la unión de variantes de alanina en residuos del dominio CH2 de la IgG1 E27 anti-IgE con FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA. El Tipo 1 suprime la unión a los tres receptores: D278A (265 en numeración EU). El Tipo 2 mejora la unión a FcγRIIA y FcγRIIB, mientras que la unión a FcγRIIIA no se ve afectada: S280A (267 en numeración EU). El Tipo 3 mejora la unión a FcγRIIA y FcγRIIB, pero reduce la unión a FcγRIIIA: H281A (268 en numeración EU). El Tipo 4 reduce la unión a FcγRIIA y FcγRIIB, aunque mejora la unión a FcγRIIIA: S317A (298 en numeración EU). El Tipo 5 mejora la unión a FcγRIIIA, pero no afecta a la unión a FcγRIIA y FcγRIIB: E352A, K353A (333 y 334 en numeración EU).

Figuras 18A y 18B: comparan el ensayo de proteína/proteína FcγRIIIA y el ensayo basado en célula de CHO GPI-FcγRIIIA, respectivamente. La Figura 18A ilustra la unión de variantes de alanina seleccionadas a proteína de fusión FcγRIIIA-GST. S317A (298 en numeración EU) y S317A/K353A (298 y 334 en numeración EU) se unen mejor que la E27 natural, mientras que D278A (265 en numeración EU) suprime casi completamente la unión. La Figura 18B ilustra que se obtiene un modelo de unión similar en células CHO que expresan una forma ligada a GPI recombinante de FcγRIIIA.

Figuras 19A y 19B: comparan el ensayo de proteína/proteína FcγRIIB y el ensayo basado en célula de CHO GPI-FcγRIIB, respectivamente. La Figura 19A ilustra la unión de variantes de alanina seleccionadas a proteína de fusión FcγRIIB-GST. H281A (268 en numeración EU) se une mejor que la E27 natural, mientras que S317A (298 en numeración EU) presenta una unión reducida. La Figura 19B ilustra que se obtiene un modelo de unión similar en células CHO que expresan una forma ligada a GPI recombinante de FcγRIIB.

Figura 20: muestra sustituciones individuales de alanina en el dominio CH2 de IgG1 anti-HER2 (HERCEPTIN®) que influyen en la unión a FcγRIIIA en células efectoras de célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). El anti-HER2 humanizado recombinante (HERCEPTIN®), que se une a células tumorales de mama SK-BR-3 que expresan HER2, fue preincubado con células SK-BR-3 marcadas con ⁵¹Cr durante 30 minutos (opsonización) a 100 ng/mL (círculos rellenos) y 1,25 ng/mL (cuadrados rellenos). Manteniendo constante la concentración de células diana tumorales SK-BR-3, se incrementó la ratio de células efectoras desde 0 hasta 100. La citotoxicidad espontánea en ausencia de anticuerpo (cuadrados rayados) fue del 20% para una ratio efector:diana (E:T) de 100:1. Una mutación individual de alanina que no afectó a la unión de FcγRIIIA, la variante G31 = R309A (292 en numeración EU), no efectuó ADCC (triángulos rellenos). Una mutación individual de alanina que solo aumentó ligeramente la unión a FcγRIIIA, la variante G30 = K307A (290 en numeración EU), también presentó una ADCC ligeramente mejorada (es decir, una mejora de 1,1 veces en la actividad de ADCC, calculada como el área bajo la curva) a 1,25 ng/mL para todas las ratios E:T (diamantes rellenos) en comparación con el anticuerpo natural a 1,25 ng/mL (cuadrados rellenos). Una mutación individual de alanina que redujo la unión a FcγRIIIA, la variante G34 = Q312A (295 en numeración EU), también mostró una actividad ADCC disminuida (triángulos invertidos rellenos).

Figura 21: ilustra que una mutación individual de alanina que presentó la mayor mejora en la unión a FcγRIIIA, la variante G36 = S317A (298 en numeración EU), en los ensayos de proteína-proteína y basados en célula también mostró la mayor mejora en ADCC (triángulos rellenos) de todas las variantes con respecto a la natural (cuadrados rellenos) a 1,25 ng/mL. G36 mostró una mejora de 1,7 veces en la actividad de ADCC, calculada como el área bajo la curva. Las variantes G17 = E282A (269 en numeración EU) y G18 = D283A (270 en numeración EU) mostraron ambas una unión reducida a FcγRIIIA, así como una eficacia reducida en ADCC. Las células efectoras fueron PBMCs.

Figura 22A: muestra alineamientos de regiones Fc de IgG de secuencia nativa. Se muestran las secuencias de región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humIgG1 (alotipos A y no A) (SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente), humIgG2 (SEQ ID NO:5), humIgG3 (SEQ ID NO:6) y humIgG4 (SEQ ID NO:7). La secuencia IgG1 humana es el alotipo no A, y las diferencias entre esta secuencia y el alotipo A (en las posiciones 356 y 358; sistema de numeración EU) se muestran debajo de la secuencia IgG1 humana. También se muestran las secuencias de región Fc de IgG murina de secuencia nativa, murIgG1 (SEQ ID NO:8), murIgG2A (SEQ ID NO:9), murIgG2B (SEQ ID NO:10) y murIgG3 (SEQ ID NO:11). La figura 22B muestra el porcentaje de identidad entre las secuencias de región Fc de la Figura 22A.

Figura 23: muestra alineamientos de secuencias de región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humIgG1 (alotipos A y no A; SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente), humIgG2 (SEQ ID NO:5), humIgG3 (SEQ ID NO:6) y humIgG4 (SEQ ID NO:7), marcando con asteriscos las diferencias entre secuencias.

Figura 24: muestra el área bajo la curva (UAC, del inglés "area under curve") para variantes seleccionadas en comparación con IgG1 anti-HER2 (HERCEPTIN®) en un ensayo de ADCC de 4 horas. Las células efectoras fueron PBMCs (N=5). La variante G36 (S317A; 298 en numeración EU) con unión mejorada a FcγRIIIA mostró una actividad mejorada de ADCC; la variante G31 (R309A; 292 en numeración EU) que no presentó una unión alterada a FcγRIIIA, tampoco presentó actividad alterada de ADCC; y la G14 (D265A; 278 en numeración EU) que presentó una unión reducida a FcγRIIIA, también presentó una actividad reducida de ADCC.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

A lo largo de la presente especificación y reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina corresponde al índice EU, según Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice EU de Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU.

Un "polipéptido original" es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que carece de una o más de las modificaciones de la región Fc descritas en la presente memoria, y que difiere en la función efectora con respecto a un polipéptido variante como el descrito en la presente memoria. El polipéptido original puede comprender una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con modificaciones de secuencia de aminoácidos pre-existentes (tal como adiciones, eliminaciones y/o sustituciones).

El término "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, p.ej., tal como se muestra en la Figura 1. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque las fronteras de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se define desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3, tal como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 1.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también referido como dominio "Cy2") normalmente se extiende desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es único en que no está emparejado estrechamente con ningún otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidrato ramificadas N-ligadas se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206 (1985).

El "dominio CH3" comprende la serie de residuos C-terminales a un dominio CH2 de una región Fc (es decir, desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 447 de una IgG).

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación a la baja de receptores de superficie celular (p.ej., receptor de célula B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc esté combinada con un dominio de unión (p.ej., un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos como los descritos en la presente memoria, por ejemplo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa se muestran en la Fig. 23 e incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como las variantes naturales de las mismas. Las regiones Fc murinas de secuencia nativa se muestran en la Fig. 22A.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud a al menos una "modificación de aminoácido" tal como se define en la presente memoria. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a una región Fc de secuencia nativa o con respecto a la región Fc de un polipéptido original, p.ej., entre aproximadamente una y aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferiblemente entre aproximadamente una y aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en la presente memoria preferiblemente poseerá al menos un 80% de homología con respecto a una región Fc de secuencia nativa y/o con respecto a una región Fc de un polipéptido original, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de homología con respecto a las mismas, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de homología con respecto a las mismas.

"Homología" se define como el porcentaje de residuos de la secuencia de aminoácidos variante que son idénticos tras alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de homología. Los métodos y los programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la técnica. Uno de dichos programas de ordenador es "Align 2", propiedad de Genentech, Inc., que fue presentado con documentación de usuario en la "United States Copyright Office", Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

El término "polipéptido que contiene región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (ver las definiciones más adelante), que comprende una región Fc.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente divididas de dichos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que presentan secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activante FcγRIIA contiene una estructura de activación basada en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene una estructura de inhibición basada en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase la revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Se pueden encontrar revisiones sobre FcRs en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, quedan contemplados por el término "FcR" de la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción con mediación celular en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcRs (p.ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconoce el anticuerpo ligado sobre una célula diana y a continuación provocan la lisis de la célula diana. Las células principales en la mediación de ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y llevan a cabo funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo las preferidas las PBMCs y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, p.ej., a partir de sangre o de PBMCs como se describe en la presente memoria.

Un polipéptido variante con afinidad de unión a FcR o actividad de ADCC "alterada" es aquel que presenta actividad de unión a FcR y/o actividad de ADCC aumentada o disminuida con respecto a un polipéptido original o un polipéptido que comprende una región de Fc de secuencia nativa. El polipéptido variante que "presenta una unión aumentada" a un FcR se une a al menos un FcR con una afinidad mejor que el polipéptido original. El polipéptido variante que "presenta una unión disminuida" a un FcR, se une a al menos un FcR con una afinidad peor que un polipéptido original. Dichas variantes que presentan una unión disminuida a un FcR pueden poseer una unión pequeña o no apreciable a un FcR, p.ej., 0-20% de unión al FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa, p.ej., tal como se determina en los Ejemplos de la presente memoria.

El polipéptido variante que se une a un FcR con una “afinidad mejor” que un polipéptido original, es aquel que se une a uno cualquiera o más de los FcRs identificados anteriormente con una afinidad de unión sustancialmente mejor que el anticuerpo original, cuando las cantidades de polipéptido variante y de polipéptido original en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, el polipéptido variante con una afinidad de unión a FcR mejorada puede presentar una mejora de entre aproximadamente 1,15 veces y aproximadamente 100 veces, p.ej., entre aproximadamente 1,2 veces y aproximadamente 50 veces, en la afinidad de unión a FcR en comparación con el polipéptido original, donde la afinidad de unión a FcR se determina, por ejemplo, como se describen en la presente memoria en los Ejemplos.

El polipéptido variante que “media en la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más efectivamente” que un anticuerpo original es aquel que *in vitro* o *in vivo* es sustancialmente más efectivo mediando en la ADCC, cuando las cantidades de polipéptido variante y anticuerpo original usadas en el ensayo son esencialmente las mismas. Generalmente, dichas variantes se identificarán usando el ensayo de ADCC *in vitro* como se ha descrito en la presente memoria, pero se contemplan otros ensayos y métodos para determinar la actividad de ADCC, p.ej., en un modelo animal, etc. La variante preferida es más efectiva entre aproximadamente 1,5 veces y aproximadamente 100 veces, p.ej., entre aproximadamente dos veces y aproximadamente cincuenta veces, en la mediación de la ADCC que el original, p.ej. en el ensayo *in vitro* descrito en la presente memoria.

Una “modificación de aminoácidos” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Los ejemplos de modificaciones incluyen una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos. La modificación de aminoácidos preferida 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 eliminación del residuo especificado, o a la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. Por inserción “adyacente” a un residuo especificado se entiende la inserción a una distancia de uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal con respecto al residuo especificado.

Una “sustitución de aminoácido” se refiere al reemplazo de al menos un residuo de aminoácido existente de una secuencia de aminoácidos predeterminada por otro residuo de aminoácido de “reemplazo” diferente. El residuo o residuos de reemplazo pueden ser “residuos de aminoácido naturales” (es decir, codificados por el código genético) y se seleccionan 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). Preferiblemente, el residuo de reemplazo no es cisteína. La sustitución con uno o más residuos de aminoácido no naturales también se contempla en la definición de una sustitución de aminoácido de la presente memoria. Un “residuo de aminoácido no natural” se refiere a un residuo, diferente a los residuos naturales enumerados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a residuo(s) de aminoácido adyacentes en una cadena de polipéptido. Los ejemplos de residuos de aminoácido no naturales incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuo de aminoácido tales como los descritos en Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202: 301-336 (1991). Para generar dichos residuos de aminoácido no naturales, se pueden usar los procedimientos de Noren et al. *Science* 244: 182 (1989) y Ellman et al., ver anterior. Resumidamente, estos procedimientos implican activar químicamente un tARN supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de la transcripción *in vitro* y la traducción del ARN.

Una “inserción de aminoácido” se refiere a la incorporación de al menos un aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Aunque la inserción normalmente consistirá en la inserción de uno o dos residuos de aminoácido, la presente solicitud contempla mayores “inserciones de péptido”, p.ej., la inserción de aproximadamente tres a aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez residuos de aminoácido. El(los) residuo(s) insertado(s) puede(n) ser natural(es) o no natural(es), tal como se ha discutido anteriormente.

Una “eliminación de aminoácido” se refiere a la eliminación de al menos un residuo de aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

“Región de bisagra” se define generalmente como la cadena entre Glu216 y Pro230 de la IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161-206 (1985)). Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando los residuos de cisteína primero y último formando puentes S-S inter-cadena pesada en las mismas posiciones.

La “región de bisagra inferior” de una región Fc normalmente se define como la cadena de residuos inmediatamente C-terminal a la región de bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc. Antes de la presente invención, la unión de FcγR se atribuía generalmente a los residuos de aminoácido de la región de bisagra inferior de una región Fc de IgG.

“C1q” es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto a dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente de la ruta de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El C1q humano se puede adquirir comercialmente, p.ej., en Quidel, San Diego, CA.

El término “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 porción de una cadena de polipéptido del mismo (p.ej., una cadena α el mismo) que es responsable de la unión a una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena α de FcR.

- 5 El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p.ej., anticuerpos bi-específicos), y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

10 “Fragmentos de anticuerpo”, tal como se define para el propósito de la presente invención, comprende una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene la capacidad de unión a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo preferiblemente retienen al menos parte de la cadena y opcionalmente la región CH1 de una cadena pesada de IgG. Más preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo retienen la región constante completa de una cadena pesada de IgG, e incluyen una cadena ligera de IgG.

20 El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades menores. Adicionalmente, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante individual del antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo de ser obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. n° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

30 Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadenas son idénticas u homólogas a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. n° 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

40 Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (p.ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se observan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Dichas modificaciones se realizan para mejorar los resultados del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op., Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

55 El término “región hipervariable” cuando se usa en la presente memoria se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un “lazo hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Residuos “estructurales” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable que no son residuos de la región hipervariable, tal como se ha definido en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan el “dominio de unión” de una proteína “adhesina” heteróloga (p.ej., un receptor, ligando o enzima) con un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de adhesina con la especificidad de unión deseada que es diferente al sitio de reconocimiento y unión de antígeno (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.

El término “dominio de unión de ligando” tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier receptor de superficie celular nativo o cualquier región o derivado del mismo que retenga al menos una capacidad cualitativa de unión a ligando de un receptor nativo correspondiente. En una realización específica, el receptor procede de un polipéptido de superficie celular que tenga un dominio extracelular que sea homólogo para un miembro de la supergenefamilia de inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la supergenefamilia de inmunoglobulinas, pero aun así quedan cubiertos específicamente por esta definición, son los receptores de citocinas, y en particular los receptores con actividad de tirosina quinasa (receptor tirosina quinasa), miembros de las superfamilias de receptores de hematopoyetina y factor de crecimiento nervioso, y moléculas de adhesión celular, p.ej., selectinas (E, L y P).

El término “dominio de unión de receptor” se usa para designar cualquier ligando nativo correspondiente a un receptor, que incluye moléculas de adhesión a células, o cualquier región o derivado de dicho ligando nativo que retenga al menos una capacidad cualitativa de unión a receptor de un ligando nativo correspondiente. Esta definición, entre otros, incluye específicamente secuencias de unión de ligandos para los receptores mencionados anteriormente.

Una “quimera de anticuerpo-inmuno adhesina” comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal como se define en la presente memoria) con al menos una inmuno adhesina (tal como se define en esta solicitud). Los ejemplos de quimeras de anticuerpo-inmuno adhesina son las quimeras bi-específicas CD4-IgG descritas en Berg et al., *PNAS (USA)* 88: 4723-4727 (1991) y Chamow et al., *J. Immunol.* 153: 4268 (1994).

Un polipéptido “aislado” es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de polipéptido, determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente hasta más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia N-terminal o interna de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de copa de giro, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. De forma ordinaria, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos que necesitan el tratamiento incluyen tanto a los que ya tienen el trastorno como a aquellos en los que se quiere prevenir el trastorno.

Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el polipéptido variante. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En una realización, el trastorno es cáncer.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular incontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Un “cáncer que expresa HER2” es aquel que comprende células que tienen la proteína de receptor HER2 (Semba et al., *PNAS (USA)* 82: 6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. *Nature* 319: 230-234 (1986) (número de acceso de Genbank X03363)) presente en sus superficies celulares, de tal modo que un anticuerpo anti-HER2 es capaz de unirse al cáncer.

La palabra “etiqueta” cuando se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. La etiqueta puede ser detectable en sí misma (p.ej., etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se encuentra habitualmente asociada en la fuente natural de ácido nucleico de polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente a la forma o presentación en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aislado, por tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal cual existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el polipéptido, donde, por ejemplo la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora ligada operativamente de un organismo hospedante particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está “ligado operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una pre-secuencia o líder secretor está ligado operativamente a ADN correspondiente a un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificadora si está posicionada de tal modo que facilite la traducción. Generalmente, “ligado operativamente” significa que las secuencias de ADN que están siendo ligadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o ligandos de oligonucleótido sintéticos de acuerdo a la práctica convencional.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen la progenie. De este modo, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objetivo primaria y los cultivos derivados de la misma, independientemente del número de transferencias. Debe entenderse que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica buscada en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenden usar designaciones distintas, quedará claro por el contexto.

El término “complejo molecular” cuando se usa en la presente memoria se refiere a la estructura relativamente estable que se forma cuando dos o más moléculas heterólogas (p.ej., polipéptidos) se unen unas a otras (preferiblemente de forma no covalente). En la presente memoria el complejo molecular preferido es un complejo inmune.

“Complejo inmune” se refiere a la estructura relativamente estable que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido que contiene región Fc heteróloga se unen uno al otro formando un complejo de mayor peso molecular. Los ejemplos de complejos inmunes son agregados antígeno-anticuerpo y agregados de molécula diana-inmuno adhesina. El término “complejo inmune” tal como se usa en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un complejo *ex vivo* (es decir, diferente a la forma o presentación en la que se puede encontrar en la naturaleza). Sin embargo, el complejo inmune puede administrarse a un mamífero, p.ej. para evaluar la eliminación del complejo inmune en el mamífero.

El término “molécula diana” se refiere a una molécula, habitualmente un polipéptido, que es capaz unirse a una molécula heteróloga y que tiene uno o más sitios de unión para la molécula heteróloga. El término “sitio de unión” se refiere a una región de una molécula a la cual se puede unir otra molécula. La “primera molécula diana” en la presente memoria comprende al menos dos sitios de unión distintos (por ejemplo, de dos a cinco sitios de unión separados) para un analito (p.ej., un polipéptido que contiene una región Fc) de tal modo que al menos dos moléculas de analito se pueden unir a la primera molécula diana. Se prefiere que los dos o más sitios de unión sean idénticos (p.ej., que tengan la misma secuencia de aminoácidos, donde la molécula diana es un polipéptido). En el Ejemplo 1 incluido más adelante, la primera molécula diana era IgE y tenía dos sitios de unión separados en su región Fc, a los cuales se podía unir el polipéptido que contiene región Fc (un anticuerpo anti-IgE, E27). Otras primeras moléculas diana incluyen dímeros de monómeros sustancialmente idénticos (p.ej., neurotrofinas, IL8 y VEGF) o son polipéptidos que comprenden dos o más cadenas de polipéptidos sustancialmente idénticas (p.ej., anticuerpos o inmuno adhesinas). La “segunda molécula diana” comprende al menos dos sitios de unión distintos (por ejemplo, de dos a cinco sitios de unión separados) para la primera molécula diana, de tal modo que al menos dos primeras moléculas diana se pueden unir a la segunda molécula diana. Preferiblemente, los dos o más sitios de unión son idénticos (p.ej., tienen la misma secuencia de aminoácidos, donde la molécula diana es un polipéptido). En el Ejemplo 2, la segunda molécula diana fue VEGF, que tiene un par de sitios de unión distintos a los cuales se podía unir el dominio variable del anticuerpo de IgE. Se contemplan otras segundas moléculas diana, p.ej., otros dímeros de monómeros sustancialmente idénticos (p.ej., neurotrofinas o IL-8) o polipéptidos que comprenden dos o más dominios sustancialmente idénticos (p.ej., anticuerpos o inmuno adhesinas).

Un “analito” es una sustancia que va a ser analizada. El analito preferido es un polipéptido que contiene región Fc que va a ser analizado para determinar su capacidad de unión a un receptor de Fc.

5 Un “receptor” es un polipéptido capaz de unirse a al menos un ligando. El receptor preferido es un receptor de superficie celular que tiene un dominio de unión a ligando extracelular y, opcionalmente, otros dominios (p.ej., dominio transmembrana, dominio intracelular y/o ancla de membrana). El receptor a evaluar en el ensayo descrito 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 a uno o más polipéptidos heterólogos). Además, el receptor a evaluar en términos de propiedades de unión puede estar presente en una célula o estar aislado y opcionalmente cubriendo una placa de ensayo o alguna otra fase sólida.

10 La frase “receptor de baja afinidad” denota un receptor que tiene una afinidad de unión débil por un ligando de interés, p.ej., que tiene una constante de unión de aproximadamente 50 nM o una afinidad peor. Los ejemplos de receptores de baja afinidad incluyen FcγRII y FcγRIII.

II. Modos de llevar a la práctica la invención

15 La invención de la presente memoria se refiere a un método para fabricar un polipéptido variante. El polipéptido “original”, “inicial” o “no variante” se prepara usando técnicas disponibles en la técnica para generar polipéptidos que comprenden una región Fc. En la realización preferida de la invención, el polipéptido original es un anticuerpo y los métodos de ejemplo para generar anticuerpo se describen con más detalle en las siguientes secciones. Sin embargo, el polipéptido original puede ser cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc, p.ej., una inmunoadhesina. Los métodos para fabricar inmunoadhesinas se elaboran con más detalle en la presente memoria más adelante.

20 En una realización alternativa, se puede generar una región Fc variante según los métodos descritos en la presente memoria y dicha “región Fc variante” puede fusionarse a un polipéptido heterólogo seleccionado, tal como un dominio variable de anticuerpo o un dominio de unión de un receptor o ligando.

25 El polipéptido original comprende una región Fc. Generalmente la región Fc del polipéptido original comprenderá una región Fc de secuencia nativa, y preferiblemente una región Fc de secuencia nativa humana. Sin embargo, la región Fc del polipéptido original puede presentar una o más alteraciones o modificaciones de secuencia de aminoácidos pre-existentes respecto a una región Fc de secuencia nativa. Por ejemplo, la actividad de unión C1q de la región Fc puede haber sido alterada previamente (más adelante se describen en detalle otros tipos de modificaciones de región Fc). En una realización adicional la región Fc del polipéptido original es “conceptual” y, aunque no exista físicamente, el ingeniero de anticuerpos puede decidir sobre una secuencia de aminoácidos de región Fc variante deseada y generar un polipéptido que comprende dicha secuencia, o un ADN que codifica la secuencia de aminoácido de región Fc variante deseada.

30 Sin embargo, en la realización preferida de la invención, se dispone de un ácido nucleico que codifica una región Fc de un polipéptido original, y dicha secuencia de ácido nucleico es alterada para generar una secuencia de ácido nucleico variante que codifica la región Fc variante.

35 El ADN que codifica una secuencia de aminoácido variante del polipéptido inicial se prepara mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, preparación mediante mutagénesis sito-dirigida (o mediada por oligonucleótido), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido.

40 La mutagénesis sito-dirigida es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Esta técnica es bien conocida en el campo (véase, p.ej., Carter et al. *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985) y Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488 (1987)). Resumidamente, para llevar a cabo la mutagénesis sito-dirigida de ADN, el ADN de partida es alterado en primer lugar hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada a una cadena individual de dicho ADN de partida. Tras la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena entera, usando el oligonucleótido hibridado como cebador, y usando la cadena individual del ADN de partida como plantilla. De este modo, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada es incorporado en el ADN de cadena doble resultante.

45 La mutagénesis de PCR también es adecuada para fabricar secuencias de aminoácido variantes del polipéptido de partida. Véase Higuchi, en *PCR Protocols*, pág. 177-183 (Academic Press, 1990); y Vallete et al., *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989). Resumidamente, cuando se usan cantidades pequeñas de ADN plantilla como material de partida en una PCR, se pueden usar cebadores que difieren ligeramente en secuencia respecto a la región correspondiente de un ADN plantilla para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia de plantilla solo en las posiciones en las que los cebadores difieren de la plantilla.

55 Otro método para preparar variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., *Gene* 34: 315-323 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN polipéptido de partida que va a ser mutado. El(los) codón(es) del ADN de partida a mutar es(son) identificado(s). Debe haber un

- único sitio de restricción de endonucleasa en cada lado del sitio(s) de mutación identificado(s). Si no existen dichos sitios de restricción, pueden ser generados usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótido descrito anteriormente para introducirlos en las posiciones apropiadas del ADN polipéptido de partida. El ADN plásmido se corta en dichos sitios para linealizarlo. Se sintetiza un oligonucleótido de cadena doble que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción, pero que contiene la(s) mutación(es) deseada(s), usando procedimientos estándar, donde las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y a continuación se hibridan juntas usando técnicas estándar. Este oligonucleótido de cadena doble se denomina casete. Dicha casete se diseña para tener extremos 5' y 3' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de tal modo que se pueden ligar directamente al plásmido. Dicho plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutado.
- 5
- 10 Alternativamente, o adicionalmente, se puede determinar la secuencia de aminoácido deseada que codifica un polipéptido variante, y se puede generar sintéticamente una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha secuencia de aminoácido variante.

La secuencia de aminoácido del polipéptido original se modifica para generar una región Fc variante con una afinidad o actividad de unión a receptor Fc alterada *in vitro* y/o *in vivo* y/o una actividad de citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) alterada *in vitro* y/o *in vivo*.

15

Generalmente, la modificación incluye una o más sustituciones de aminoácido. En una realización, el residuo de reemplazo no se corresponde con un residuo presente en la misma posición en cualquiera de las regiones Fc de secuencia nativa de la Figura 22A. Por ejemplo, según esta realización, Pro331 de una región Fc de IgG3 o IgG1 humana es reemplazado por un residuo diferente a Ser (el residuo alineado correspondiente observado en la secuencia nativa de la IgG4 humana). En una realización, el residuo del polipéptido original que es sustituido con un residuo de reemplazo no es una alanina y/o no es el residuo Ala339 de una región Fc. En el caso de una sustitución de aminoácido, preferiblemente el residuo del polipéptido original es reemplazado por un residuo de alanina. Sin embargo, la presente invención contempla el reemplazo del residuo en el polipéptido original con cualquier otro residuo de aminoácido. La sustitución puede ser, por ejemplo, una "sustitución conservadora". Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el título de "sustitución preferida". Se pueden lograr cambios más sustanciales haciendo una o más "sustituciones ejemplares" que no son la sustitución preferida de la Tabla 1.

20

25

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustitución preferida
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gin; asn	lys
Asn (N)	gin; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gin (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se pueden obtener modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la región Fc seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hélice o con conformación helicoidal; (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a propiedades comunes de la cadena lateral:

- 5 (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asp, glu;
- 10 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Los ejemplos de sustituciones de aminoácido conservadoras y no conservadoras se incluyen en la Tabla 8 de la presente memoria.

- 15 Como se demuestra en el Ejemplo 4 de la presente memoria, se puede diseñar una región Fc variante con una afinidad de unión alterada con uno o más FcRs. Como se muestra en dicho Ejemplo, se pueden preparar diferentes clases de variantes de región Fc, p.ej., como resume en la siguiente tabla. Cuando la región Fc variante tiene más de una sustitución de aminoácido, generalmente, pero no necesariamente, se combinan sustituciones de aminoácido en la misma clase para alcanzar el resultado deseado.

20

Tabla 2

CLASES DE VARIANTES DE REGIÓN Fc		
Clase	Propiedad de unión a FcR	Posición de la(s) sustitución(es) de región Fc
1A	unión reducida a todos los FcR	238*, 265, 269, 270, 297°, 327, 329*,
1B	unión reducida a FcRII y FcRIII	239*, 294, 295, 303, 338, 373, 376, 416, 435
2	unión mejorada a FcRII y FcRIII	256, 290, 312, 326, 330, 339*, 378, 430
3	unión mejorada a FcRII y no efecto en la unión a FcRIII	255, 258, 267, 276, 280, 283, 285, 286, 305, 307, 309, 315, 320, 331, 337, 398
4	unión mejorada a FcRII y unión reducida a FcRIII	268, 272, 301, 322*, 340
5	unión reducida a FcRII y no efecto en la unión a FcRIII	292, 324, 335, 414, 419, 438, 439
6	unión reducida a FcRII y unión mejorada a FcRIII	298, 333
7	no efecto en la unión a FcRII y unión reducida a FcRIII	248, 249, 252, 254, 278, 289, 293, 296, 338, 382, 388, 389, 434, 437
8	no efecto en la unión a FcRII y unión mejorada a FcRIII	334, 360
° versión desglucosilada * no según la invención # Preferiblemente combinada con otra(s) modificación(es) de región Fc (p.ej., como las descritas en la presente memoria)		

Aparte de las sustituciones de aminoácido, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región Fc original a fin de generar una región Fc variante con función efectora alterada.

- 25 Por ejemplo, se puede eliminar uno o más residuos de aminoácido de la región Fc a fin de reducir la unión a un FcR. Generalmente, se eliminará uno o más de los residuos de la región Fc identificados en la presente memoria como responsables de la unión a FcR (véase más adelante el Ejemplo 4) a fin de generar dicha región Fc variante. Generalmente, no se eliminarán más de entre uno y aproximadamente diez residuos de la región Fc según esta realización de la invención. La región Fc de la presente memoria que comprende una o más eliminaciones de aminoácidos preferiblemente retendrá al menos aproximadamente el 80%, y preferiblemente al menos

aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, de la región Fc original o de una región Fc humana de secuencia nativa.

También se pueden preparar regiones Fc variantes de inserción de aminoácido, variantes que presentan una función efectora alterada. Por ejemplo, se puede introducir al menos un residuo de aminoácido (p.ej., de uno a dos residuos de aminoácido y generalmente no más de diez residuos) adyacentes a una o más de las posiciones de región Fc identificadas en la presente memoria como responsables de la unión a FcR. Con "adyacente" se pretende indicar a una distancia de uno o dos residuos de aminoácido de un residuo de la región Fc identificado en la presente memoria. Dichas regiones Fc variantes pueden presentar una unión mejorada o disminuida a FcR y/o una actividad de ADCC mejorada o disminuida. Para generar dichas variantes de inserción, se puede evaluar una estructura de co-cristal de un polipéptido que comprende una región de unión de un FcR (p.ej., el dominio extracelular del FcR de interés) y la región Fc en la que el(los) residuo(s) de aminoácido van a ser insertados (véase, por ejemplo, Deisenhofer, *Biochemistry* 20(9): 2361-2370 (1981); y Burmeister et al., *Nature* 342: 379-383, (1994)) a fin de diseñar racionalmente una región Fc variante con, p.ej., una capacidad de unión a FcR mejorada. Dicha(s) inserción(es) generalmente se harán en un bucle de la región Fc, pero no en la estructura secundaria (es decir, en una cadena β) de la región Fc.

Introduciendo las modificaciones de secuencia de aminoácido apropiadas en una región Fc original, se puede generar una región Fc variante que (a) medie en la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficientemente y/o (b) se una a un receptor Fc gamma (FcyR) con una mejor afinidad que el polipéptido original. Dichas regiones Fc variantes generalmente comprenderán al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. La combinación de modificaciones de aminoácido se cree que es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en su interior, p.ej., de las posiciones de la región Fc identificadas en la presente memoria.

Preferiblemente, la región Fc del polipéptido original es una región Fc humana, p.ej., una región Fc humana de secuencia nativa de las regiones Fc de IgG1 (alotipos A y no A), IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. Dichas secuencias se muestran en la Figura 23.

Para generar una región Fc con una actividad ADCC mejorada, el polipéptido original preferiblemente presenta una actividad ADCC pre-existente, p.ej., comprende una región de Fc de IgG1 humana o de IgG3 humana. En una realización, la variante con ADCC mejorada media en la ADCC de forma sustancialmente más efectiva que un anticuerpo con una región de Fc de IgG1 o IgG3 de secuencia nativa y que la región de unión a antígeno de la variante. Preferiblemente, la variante comprende, o consta esencialmente de, sustituciones de dos o tres de los residuos de las posiciones 298, 333 y 334 de la región Fc. Lo más preferiblemente, los residuos de las posiciones 298, 333 y 334 son sustituidos, (p.ej., por residuos de alanina). Además, a fin de generar la región Fc variante con una actividad ADCC mejorada, se puede diseñar de forma general una región Fc variante con una afinidad de unión mejorada a FcyRIII, que se cree que es un FcR importante en la mediación de la ADCC. Por ejemplo, se puede introducir una modificación de aminoácido (p.ej., una sustitución) en la región Fc original en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 para generar dicha variante. La variante con una afinidad de unión a FcyRIII mejorada puede además presentar una afinidad de unión a FcyRII reducida, especialmente una afinidad reducida de unión al receptor FcyRIIB.

La(s) modificación(es) de aminoácido se introducen preferiblemente en el dominio CH2 de una región Fc, ya que los experimentos de la presente memoria indican que el dominio CH2 es importante para la actividad de unión a FcR. Además, al contrario que lo indicado por la técnica citada anteriormente, la presente solicitud contempla la introducción de una modificación en una parte de la región Fc distinta a su región de bisagra inferior.

Las posiciones de aminoácido útiles para modificación con el objetivo de generar una región Fc de IgG humana variante con afinidad o actividad de unión a receptor gamma de Fc (FcyR) incluyen una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 324, 326, 327, 330, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc.

Para generar una región Fc variante con una unión reducida al FcyR se puede introducir una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 285, 268, 289, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc.

Las variantes que presentan una unión reducida a FcyRI, incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270 o 327.

Las variantes que presentan una unión reducida a FcyRII incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439.

Las regiones Fc variantes que presentan una unión reducida a FcγRIII incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una o más de las posiciones de aminoácido 248, 249, 252, 254, 265, 268, 289, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 298, 301, 303, 327, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437.

- 5 También se pueden preparar variantes con una unión mejorada a uno o más FcγRs, de tal modo que las regiones Fc variantes pueden comprender una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 255, 258, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430 de la región Fc.

- 10 Por ejemplo, la variante con una actividad de unión a FcγR mejorada puede presentar una unión mejorada a FcγRIII, y opcionalmente puede presentar además una unión disminuida a FcγRII; p.ej., la variante puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 298 y/o 333 de una región Fc.

- 15 Las variantes con una unión mejorada a FcγRII incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 337, 340, 378, 398 o 430 de una región Fc. Dichas variantes pueden presentar además una unión disminuida a FcγRIII. Por ejemplo, pueden incluir una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 266, 272, 298, 301 o 340.

- 20 Aunque se prefiere alterar la unión a un FcγR, en la presente memoria también se contemplan regiones Fc variantes con afinidad de unión alterada por receptor neonatal (FcRn). Se anticipa que las regiones Fc variantes con afinidad mejorada por FcRn tienen mayores vidas medias en suero, y dichas moléculas tendrán aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos cuando se desee una vida media larga del polipéptido administrado, p.ej., para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Las regiones Fc variantes con una afinidad de unión a FcRn disminuida, por el contrario, es de esperar que tengan vidas medias más cortas, y dichas moléculas pueden administrarse, por ejemplo, a un mamífero cuando pueda ser ventajoso un tiempo en circulación más corto, p.ej., para obtención de imágenes diagnósticas *in vivo* o para polipéptidos que tengan efectos secundarios tóxicos cuando se encuentran circulando en el torrente sanguíneo durante largos periodos de tiempo, etc. Se anticipa que las regiones Fc variantes con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan menos probabilidad de atravesar la placenta, y por tanto pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

- 30 Las regiones Fc variantes con afinidad de unión a FcRn alterada incluyen aquellas que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 253, 255, 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 presentan una afinidad reducida por FcRn generalmente comprenderán una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447; y aquellas con una unión incrementada a FcRn normalmente comprenderán una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434.

- 40 El(los) polipéptido(s) variante(s) preparados como se ha descrito anteriormente pueden ser sometidos a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso pretendido para el polipéptido. Dichas modificaciones pueden implicar una alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o eliminación de residuos de aminoácido), fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Dichas "modificaciones adicionales" pueden realizarse antes, o simultáneamente, o después de la(s) modificación(es) de aminoácido descritas anteriormente que resultan en una alteración de la unión a receptor de Fc y/o de la actividad de ADCC. En una realización, se puede combinar la modificación de la región Fc de la presente memoria con sustituciones de la región Fc descritas en las referencias citadas en la sección de "Técnica relacionada" de esta solicitud.

- 45 Alternativa o adicionalmente, puede ser útil combinar las anteriores modificaciones de aminoácidos con una o más modificaciones de aminoácido adicionales que alteren la unión a C1q y/o la función de citotoxicidad dependiente de complemento de la región Fc.

- 50 El polipéptido de partida de interés particular en la presente memoria habitualmente es uno que se une a C1q y que presenta citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácido adicionales descritas en la presente memoria generalmente servirán para alterar la capacidad del polipéptido de partida para unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente de complemento, p.ej., reducir y preferiblemente suprimir dichas funciones efectoras. Sin embargo, en la presente memoria se contemplan los polipéptidos que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con unión mejorada a C1q y/o función mejorada de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por ejemplo, el polipéptido de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar en la CDC y puede modificarse de acuerdo a los conocimientos descritos en la presente memoria, de tal modo que adquiere dichas funciones efectoras adicionales. Además, los polipéptidos con actividad de unión a C1q pre-existente, que opcionalmente tienen la capacidad de mediar en la CDC, pueden ser modificados de tal modo que una o ambas de estas actividades sean potenciadas.

5 Para generar una región Fc con unión a C1q alterada y/o función alterada de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), las posiciones de aminoácido a modificar generalmente se seleccionan de las posiciones de la cadena pesada 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 y 334, donde la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG corresponde al índice EU de Kabat et al., **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, solo una de las ocho posiciones identificadas anteriormente es alterada con el objetivo de generar la región de polipéptido variante con unión a C1q alterada y/o función alterada de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Preferiblemente solo el residuo 270, 329 o 322 es alterado si se da el caso. Alternativamente, dos o más de las posiciones identificadas anteriormente son modificadas. Si las sustituciones deben estar combinadas, generalmente se combinan las sustituciones que potencian la unión a C1q humano (p.ej., en las posiciones de residuo 326, 327, 333 y 334) o las que disminuyen la unión a C1q humano (p.ej., en las posiciones de residuo 270, 322, 329 y 331). En la última realización, las cuatro posiciones (es decir, 270, 322, 329 y 331) pueden ser sustituidas. Preferiblemente, las sustituciones adicionales en dos, tres o todas las posiciones 326, 327, 333 o 334 se combinan, opcionalmente con otras sustituciones de región Fc, para generar un polipéptido con unión a C1q humano mejorada y preferiblemente con actividad de CDC mejorada *in vitro* o *in vivo*.

15 La prolina está conservada en la posición 329 de las IgGs humanas. Este residuo preferiblemente es reemplazado con alanina, sin embargo, se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido, p.ej., serina, treonina, asparagina, glicina o valina.

20 La prolina está conservada en la posición 331 de la IgG1, IgG2 e IgG3 humanas, pero no en la IgG4 humana (que tiene un residuo de serina en la posición 331). El residuo 331 preferiblemente es reemplazado por alanina u otro aminoácido, p.ej., serina (para regiones de IgG diferentes a IgG4), glicina o valina.

La lisina 322 está conservada en las IgGs humanas, y este residuo preferiblemente está reemplazado por un residuo de alanina, pero se contempla la sustitución con cualquier otro residuo de aminoácido, p.ej., serina, treonina, glicina o valina.

25 D270 está conservado en las IgGs humanas, y este residuo puede estar reemplazado por otro residuo de aminoácido, p.ej., alanina, serina, treonina, glicina, valina o lisina.

K326 también está conservado en IgGs humanas. Este residuo puede ser sustituido por otro residuo que incluye, aunque sin limitación, valina, ácido glutámico, alanina, glicina, ácido aspártico, metionina o triptófano, siendo preferido el triptófano.

30 Del mismo modo, E333 también está conservado en las IgGs humanas. E333 preferiblemente es reemplazado por un residuo de aminoácido con un volumen de cadena lateral más pequeño, tal como valina, glicina, alanina o serina, siendo preferida la serina.

K334 está conservado en las IgGs humanas y puede sustituirse por otro residuo tal como alanina u otro residuo.

35 En la IgG1 e IgG3 humanas, el residuo 327 es una alanina. Para generar una variante con unión mejorada a C1q, dicha alanina puede ser sustituida por otro residuo tal como glicina. En la IgG2 y la IgG4, el residuo 327 es una glicina y ésta puede reemplazarse por alanina (u otro residuo) para disminuir la unión a C1q.

40 Tal como se ha descrito anteriormente, se puede diseñar una región Fc con función efectora alterada, p.ej., mediante la modificación de la unión a C1q y/o la unión a FcR, cambiando con ello la actividad de CDC y/o la actividad de ADCC. Por ejemplo, se puede generar una región Fc variante con unión a C1q mejorada y una unión a FcγRIII mejorada; p.ej., que tenga tanto una actividad de ADCC mejorada como una actividad de CDC mejorada. Alternativamente, cuando se desea que la función efectora se reduzca o se suprima, se puede diseñar una región Fc variante con actividad reducida de CDC y/o con actividad reducida de ADCC. En otras realizaciones, se puede aumentar solo una de dichas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, p.ej. para generar una región Fc variante con actividad de ADCC mejorada, pero con actividad de CDC reducida y viceversa.

45 Con respecto a otras alteraciones de secuencia de aminoácido adicionales, también se puede sustituir cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del polipéptido variante, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir un reticulamiento aberrante.

50 Otro tipo de sustitución de aminoácido sirve para alterar el patrón de glicosilación del polipéptido. Esto puede lograrse eliminando uno o más restos de carbohidrato presentes en el polipéptido, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido. La glicosilación de polipéptidos típicamente es N-ligada u O-ligada. N-ligada se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de dichas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. Glicosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-

hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al polipéptido se lleva a cabo de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también puede realizarse mediante la adición, o la sustitución, de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido original (para sitios de glicosilación O-ligados). Un ejemplo de variante de glicosilación tiene una sustitución de aminoácido del residuo Asn 297 de la cadena pesada.

Además, la clase, subclase o alotipo de la región Fc puede ser alterada mediante una o más sustituciones de aminoácido adicionales para generar una región Fc con una secuencia de aminoácidos más homóloga a una clase, subclase o alotipo diferente, según se desee. Por ejemplo, se puede alterar una región Fc para generar una secuencia de aminoácido más homóloga a una región Fc humana; una región Fc de IgG1 humana de alotipo no A puede ser modificada para obtener una región Fc de IgG1 humana de alotipo A, etc. En una realización, la(s) modificación(es) de aminoácido de la presente memoria que altera(n) la unión a FcR y/o la actividad de ADCC se realizan en el dominio CH2 de la región Fc y el dominio CH3 es eliminado o reemplazado por otro dominio de dimerización. Preferiblemente, sin embargo, el dominio CH3 es mantenido (aparte de las modificaciones de aminoácido realizadas en el mismo que alteran la función efectora, tal como se describe en la presente memoria).

El polipéptido variante puede ser sometido a uno o más ensayos para evaluar cualquier cambio en la actividad biológica con respecto al polipéptido de partida.

Preferiblemente, el polipéptido variante retiene esencialmente la capacidad para unirse a antígeno en comparación con el polipéptido no variante, es decir, la capacidad de unión no es peor de aproximadamente 20 veces, p.ej., no peor de aproximadamente 5 veces, la del polipéptido no variante. La capacidad de unión del polipéptido variante puede determinarse usando técnicas tales como el análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA), por ejemplo.

La capacidad del polipéptido variante para unirse a un FcR puede ser evaluada. Cuando el FcR es un receptor de Fc de alta afinidad, tal como FcγRI, FcRn o FcγRIIIA-V158, la unión se puede medir mediante una valoración del polipéptido variante monomérico y midiendo el polipéptido variante ligado usando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido variante en un formato ELISA estándar (véase el Ejemplo 2 más adelante). Otro ensayo de unión a FcR para FcRs de baja afinidad se describe en los Ejemplos 1 y 4.

Para determinar la actividad de ADCC del polipéptido variante, se puede llevar a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en el Ejemplo 4, usando ratios efector:diana variables. Las "células efectoras" útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC del polipéptido variante se puede determinar *in vivo*, p.ej., en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. **PNAS (USA)** 95: 652-656 (1998).

Se puede determinar la capacidad de la variante para unirse a C1q y mediar en la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Para determinar la unión a C1q, se puede llevar a cabo un ELISA de unión a C1q. Resumidamente, se puede recubrir placas de ensayo durante una noche a 4°C con polipéptido variante o polipéptido de partida (control) en tampón de recubrimiento. A continuación, las placas pueden ser lavadas y bloqueadas. Después del lavado, se puede añadir una alícuota de C1q humano a cada pocillo e incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se puede añadir a cada pocillo 100 µL de un anticuerpo conjugado a peroxidasa de C1q anti-complemento de oveja e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se puede volver a lavar con tampón de lavado y se puede añadir a cada pocillo 100 µL de tampón de sustrato que contiene OPD (dihidrocloruro de O-fenilendiamina (Sigma)). La reacción de oxidación, observada a través de la aparición de un color amarillo, se deja evolucionar durante 30 minutos y se detiene mediante la adición de 100 µL de H₂SO₄ 4,5 N. A continuación, se puede leer la absorbancia a (492-405) nm.

Un ejemplo de polipéptido variante es aquel que presenta una "reducción significativa en la unión a C1q" en este ensayo. Esto significa que aproximadamente 100 µg/mL del polipéptido variante dan lugar a una reducción de 50 veces o más en la unión a C1q con respecto a 100 µg/mL de un anticuerpo de control que tenga una región Fc de IgG1 no mutada. En la realización más preferida, el polipéptido variante "no se une a C1q", es decir, 100 µg/mL del polipéptido variante dan lugar a una reducción de aproximadamente 100 veces en la unión a C1q con respecto a 100 µg/mL del anticuerpo de control.

Otro ejemplo de variante es una que "presenta una mejor afinidad de unión a C1q humano que el polipéptido de partida". Dicha molécula puede presentar una mejora de la unión a C1q, por ejemplo, de aproximadamente dos veces o más, y preferiblemente de aproximadamente cinco veces o más, con respecto al polipéptido de partida (p.ej., a los valores de IC₅₀ correspondientes a estas dos moléculas. Por ejemplo, la unión a C1q humano puede ser de aproximadamente dos veces a aproximadamente 500 veces, y preferiblemente de aproximadamente dos veces o de aproximadamente cinco veces a aproximadamente 1000 veces la del polipéptido original.

Para determinar la activación de complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), p.ej., como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Resumidamente, diversas concentraciones del polipéptido variante y de complemento humano pueden diluirse con tampón. Las células que expresan el antígeno al cual se une el polipéptido variante se pueden diluir hasta una densidad de $\sim 1 \times 10^6$ células/mL. Las mezclas de polipéptido variante, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno se pueden añadir a una placa de 96 pocillos de cultivo de tejidos de fondo plano y dejar incubarse durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por complemento. A continuación se pueden añadir 50 µL de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubarse durante una noche a 37°C. La absorbancia se mide usando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados se pueden expresar en unidades de fluorescencia relativas (RFU). Las concentraciones de muestra se pueden calcular a partir de una curva de calibrado y se puede presentar la actividad porcentual correspondiente al polipéptido variante de interés en comparación con un polipéptido no variante.

Otro ejemplo de variante adicional “no activa complemento”. Por ejemplo, 0,6 µg/mL del polipéptido variante dan lugar a aproximadamente 0-10% de actividad de CDC en este ensayo en comparación con 0,6 µg/mL de un anticuerpo de control que tiene una región Fc de IgG1 no mutada. Preferiblemente, la variante no parece tener ninguna actividad de CDC en el anterior ensayo de CDC.

La invención también incluye un polipéptido variante con CDC potenciada en comparación con un polipéptido original, p.ej., que presenta aproximadamente dos veces a aproximadamente 100 veces de mejora en la actividad de CDC *in vitro* o *in vivo* (p.ej., a los valores de IC₅₀ correspondientes a cada molécula que esté siendo comparada).

A. Ensayo de unión a receptor y complejo inmune

Se ha desarrollado un ensayo de unión en la presente memoria que es particularmente útil para determinar la unión de un analito de interés a un receptor, donde la afinidad del analito por el receptor es relativamente débil, p.ej., en el rango micromolar como es el caso para FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcγRIIIB. El método implica la formación de un complejo molecular que tiene una avidéz mejorada por el receptor de interés en comparación con el analito no acomplejado. El complejo molecular preferido es un complejo inmune que comprende: (a) un polipéptido que contiene región Fc (tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina); (b) una primera molécula diana que comprende al menos dos sitios de unión para el polipéptido que contiene región Fc; y (c) una segunda molécula diana que comprende al menos dos sitios de unión para la primera molécula diana.

En el Ejemplo 1 incluido a continuación, el polipéptido que contiene región Fc es un anticuerpo anti-IgE, tal como el anticuerpo E27 (Figs. 4A-4B). E27, cuando se mezcla con IgE humana en una ratio molar 1:1, forma un hexámero estable que consiste en tres moléculas de E27 y tres moléculas de IgE. En el Ejemplo 1 presentado más adelante, la “primera molécula diana” es una forma quimérica de IgE en la que la porción Fab de un anticuerpo anti-VEGF está fusionada a la porción Fc de IgE humana y la “segunda molécula diana” es el antígeno al cual se une Fab (es decir, VEGF). Cada molécula de IgE se une a dos moléculas de VEGF. VEGF también se une a dos moléculas de IgE por molécula de VEGF. Cuando se añade VEGF humano recombinante en una ratio molar 2:1 a los hexámeros de IgE:E27, los hexámeros fueron ligados en complejos de mayor peso molecular a través de la interacción IgE:VEGF (Fig. 5). La región Fc del anticuerpo anti-IgE del complejo inmune resultante se une a FcR con mayor avidéz que el anti-IgE no acomplejado o que los hexámeros anti-IgE:IgE.

Se contemplan otras formas de complejos moleculares para uso en el ensayo de receptor. Los ejemplos que comprenden solo una combinación de polipéptido que contiene región Fc:primera molécula diana incluye una combinación de inmunoadhesina:ligando tal como inmunoadhesina de receptor de VEGF (KDR):VEGF y un anticuerpo biespecífico de longitud completa (bsAb):primera molécula diana. Un ejemplo adicional de una combinación de polipéptido que contiene región Fc:primera molécula diana:segunda molécula diana incluye una combinación de anticuerpo no bloqueante:receptor soluble:ligando tal como anticuerpo anti-Trk:receptor de Trk soluble:neurotrofina (Urfer et al., *J. Biol. Chem.* 273(10): 5829-5840 (1998)).

Aparte del uso en un ensayo de unión a receptor, los complejos inmunes descritos anteriormente tienen usos adicionales que incluyen la evaluación de la función de polipéptido que contiene región Fc y la eliminación *in vivo* del complejo inmune. Por tanto, el complejo inmune puede administrarse a un mamífero (p.ej., en un estudio pre-clínico con animales) y evaluarse para determinar su vida media, etc.

Para determinar la unión a receptor, un polipéptido que comprende al menos el dominio de unión del receptor de interés (p.ej., el dominio extracelular de una subunidad α de un FcR) se puede extender sobre una fase sólida, tal como una placa de ensayo. El dominio de unión del receptor solo de una proteína receptor-fusión se puede extender sobre la placa usando procedimientos estándar. Los ejemplos de proteínas de fusión de receptor incluyen la proteína de fusión receptor-glutaciona S-transferasa (GST), la proteína de fusión receptor-dominio de unión a quitina, la proteína de fusión receptor-etiqueta hexaHis (extendidas sobre placas recubiertas de glutaciona, quitina y níquel, respectivamente). Alternativamente, se puede extender una molécula de captura sobre la placa de ensayo y usarse para ligar el receptor-proteína de fusión a través de la porción que no es receptor de la proteína de fusión. Los ejemplos incluyen anti-hexaHis F(ab')₂ extendido sobre la placa de ensayo usada para captura el receptor-fusión de cola hexaHis o anticuerpo anti-GST extendido sobre la placa de ensayo usada para captura un receptor-fusión GST. En otras realizaciones, la unión a células que expresan al menos el dominio de unión del receptor puede evaluarse. Las células pueden ser células hematopoyéticas naturales que expresan el FcR de interés o pueden transformarse

con ácido nucleico que codifica el FcR o un dominio de unión del mismo, de tal modo que el dominio de unión se expresa en la superficie de la célula que va a ser evaluada.

El complejo inmune descrito anteriormente en la presente memoria se añade a las placas recubiertas con receptor y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente, de tal modo que el analito se une al receptor. Las placas pueden ser lavadas entonces para eliminar los complejos no ligados, y la unión del analito se puede detectar según métodos conocidos. Por ejemplo, la unión se puede detectar usando un reactivo (p.ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) que se une específicamente al analito, y que opcionalmente está conjugado con una etiqueta detectable (las etiquetas detectables y los métodos para conjugarlas a polipéptidos se describen más adelante, en la sección titulada "Usos no terapéuticos del polipéptido variante").

Por conveniencia, los reactivos se pueden proporcionar en un kit de ensayo, es decir, una combinación empaquetada de reactivos, para combinación con el analito a la hora de determinar la capacidad del analito para unirse a un receptor de interés. Los componentes del kit generalmente serán proporcionados en ratios predeterminadas. El kit puede proporcionar la primera molécula diana y/o la segunda molécula diana, opcionalmente formando un complejo juntas. El kit puede incluir además placas de ensayo recubiertas con el receptor o un dominio de unión del mismo (p.ej., el dominio extracelular de la subunidad α de un FcR). Habitualmente, en el kit se proporcionarán otros reactivos, tales como un anticuerpo que se une específicamente al analito a ensayar, marcado directa o indirectamente con una etiqueta enzimática. Cuando la etiqueta detectable es una enzima, el kit incluirá los sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p.ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Adicionalmente, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (p.ej., tampón de ensayo y/o de lisis de lavado) y otros similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada. El kit también incluye de forma adecuada instrucciones para llevar a cabo el ensayo.

B. Preparación de anticuerpos

En la realización preferida de la invención, el polipéptido que contiene región Fc que es modificado según lo mostrado en la presente memoria es un anticuerpo. A continuación se indican las técnicas para producir anticuerpos:

(i) Selección y preparación de antígeno

Cuando el polipéptido es un anticuerpo, está dirigido contra un antígeno de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico para dicho mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos que no son polipéptidos (tales como antígenos de glicolípido asociados a tumor; véase la Patente de EE.UU. 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (p.ej., un receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Los ejemplos de antígenos incluyen moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, que incluye hormona de crecimiento humano y hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante tiroidea; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante de foliculo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores coagulantes tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF), y factor de von Willebrands; factores anti-coagulación tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulado por activación normalmente célula T expresada y secretada); proteína inflamatoria de macrófago humano (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como albúmina de suero humana; sustancia inhibidora de Muellerian; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; pro-relaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), 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); factor de crecimiento de fibroblasto tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, que incluye TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor I y II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonia (CSFs), p.ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILs), p.ej., de IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de célula T; proteínas de membrana superficial; factor de aceleración de decaimiento; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores albergadores; adresasinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un

ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Las moléculas diana preferidas para anticuerpos incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; los miembros de la familia de receptor ErbB tales como el receptor de EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha 4/\beta 7$ e integrina $\alpha v/\beta 3$, que incluyen tanto las subunidades α de la misma como las subunidades β (p.ej., anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; factor tisular (TF); interferón alfa (α -IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/ft3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, etc.

- 5 Los antígenos solubles o los fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, se pueden usar como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tal como receptores, fragmentos de éstos (p.ej., el dominio extracelular de un receptor) se pueden usar como inmunógeno. Alternativamente, se pueden usar como inmunógeno células que expresan la molécula transmembrana. Dichas células pueden derivarse de una fuente natural (p.ej., líneas de células cancerosas) o pueden ser células que han sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos, útiles para preparar anticuerpos, serán evidentes para los especialistas en la técnica.

(ii) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales preferiblemente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil para conjugar el antígeno relevante a una proteína que sea inmunogénico en la especie a inmunizar, p.ej., hemocianina de lapa de ojo de cerradura, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

- 25 Los animales son inmunizados contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados, combinando, p.ej., 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, se aplica un recuerdo a los animales de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después, se toman muestras sanguíneas de los animales y se evalúa el título de anticuerpos en suero. Se aplican nuevos recuerdos hasta que el título alcanza un valor constante. Preferiblemente, se aplica un recuerdo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo celular recombinante como proteínas de fusión. Asimismo, de forma adecuada se usan agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

35 (iii) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método de hibridoma descrito originalmente por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinantes (Patente de EE.UU. n° 4.816.567).

- 40 En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedante apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, es inmunizado como se ha indicado previamente en la presente memoria para activar linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación los linfocitos son condensados con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academia Press, 1986)).

- 45 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se crecen en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

- 50 Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, apoyan la producción a alto nivel y estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tal como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el "Salk Institute Cell Distribution Center", San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la "American Type Culture Collection", Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001

(1984); Brodeur et al., **Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications**, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

5 El medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma es evaluado para la producción de anticuerpo monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

10 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse limitando procedimientos de dilución y creciendo mediante métodos estándar (Goding, **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

15 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

20 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es aislado y secuenciado fácilmente usando procedimientos convencionales (p.ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación son transferidos a células hospedantes tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle más adelante.

25 En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty 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, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (en el rango de nM) mediante barajado de cadenas (Marks et al., **Bio/Technology**, 10: 779-783 (1992)), así como mediante infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., **Nuc. Acids. Res.**, 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

35 El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora para los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina parte o toda la secuencia codificadora para un polipéptido no inmunoglobulina.

40 Típicamente, dichos polipéptidos no inmunoglobulina son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

45 Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en su interior procedentes de una fuente no humana. Dichos residuos de aminoácido no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que son tomados habitualmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., **Nature**, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., **Nature**, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., **Science**, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDRs o secuencias de CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. n° 4.816.567) donde se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

55 La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es cribada contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la de roedor es

aceptada entonces como la región estructural humana (FR) correspondiente al anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa una estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura puede usarse para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos sean humanizados reteniendo la alta afinidad por el antígeno, así como otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y de las humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran disponibles habitualmente y son familiares para los especialistas en la técnica. Se dispone de programas de ordenador que ilustran y presentan las estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar residuos FR y combinarlos a partir de secuencias de importación y receptoras de tal modo que se alcance la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR están implicados directamente y lo más sustancialmente en la influencia sobre la unión a antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (p.ej., ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de región de unión de cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del sistema de genes de inmunoglobulina de línea germinal humanos a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras exposición a antígeno. Véase, p.ej., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y Duchosal et al., *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también se pueden derivar de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Vaughan et al., *Nature Biotech* 14: 309 (1996)).

(v) Anticuerpos multi-específicos

Los anticuerpos multi-específicos tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente se unirán solamente a dos antígenos (es decir, anticuerpos bi-específicos, BsAbs), también se incluyen en la expresión cuando se usa en la presente memoria los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos tri-específicos. Los ejemplos de BsAbs incluyen aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula de activación citotóxica tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de célula renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de hormona estimulante de melanocito, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión de célula neural (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a pan-carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-IgD-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de ricina, anti-interferón α (IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-vinca alcaloide; BsAbs para convertir profármacos activados por enzima tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAbs que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tejido (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunes a receptores de superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor de Fc (p.ej., FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para uso en terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus de herpes simple (HSV), anti-complejo de receptor de célula T:CD3/anti-gripe; anti-FcγR/anti-VIH; BsAbs para detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacuna; y BsAbs como herramientas diagnósticas tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos tri-específicos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos bi-específicos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpos (p.ej., anticuerpos bi-específicos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos bi-específicos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos bi-específicos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura bi-específica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se

hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y los rendimientos a producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

5 Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) son fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y son co-transfectados en un organismo hospedante adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando ratios desiguales de las tres cadenas de polipéptido en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o para las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en ratios iguales da como resultado rendimientos elevados, o cuando las ratios no tienen una significancia particular.

20 En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos bi-específicos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto bi-específico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solo en una mitad de la molécula bi-específica proporciona un modo sencillo de separación. Esta estrategia se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos bi-específicos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986). Según otra estrategia descrita en el documento WO 25 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados de un cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales de mayor tamaño (p.ej., tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras pequeñas (p.ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados, tal como homodímeros.

35 Los anticuerpos bi-específicos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de EE.UU. n° 4.676.980), y para el tratamiento de infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes reticulantes adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

40 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos tri-específicos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

45 Aunque el polipéptido de interés en la presente memoria es preferiblemente un anticuerpo, se contemplan otros polipéptidos que contienen región Fc que pueden ser modificados según los métodos descritos en la presente memoria. Un ejemplo de dichas moléculas es una inmunoadhesina.

C. Preparación de inmunoadhesina

50 El diseño de inmunoadhesina más simple y más directo combina el(los) dominio(s) de unión de la adhesina (p.ej., el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. De forma ordinaria, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará C-terminalmente a ácido nucleico que codifica el extremo-N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, también son posibles las fusiones N-terminales.

55 Típicamente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos los dominios funcionalmente activos de bisagra, C_{H2} y C_{H3} de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones en el extremo-C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al C_{H1} de la cadena pesada o de la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio exacto en el que se realiza la fusión no es crítico; sitios concretos son bien conocidos y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona al extremo-N de la región Fc de la inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar la región constante de cadena pesada entera a la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferiblemente, en la fusión se usa una secuencia que empieza en la región de bisagra justo por encima del sitio de ruptura de papaína que define químicamente la Fc de IgG (es decir, el residuo 216, considerando que el primer residuo de la región constante de cadena pesada es el 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácido de adhesina está fusionada a (a) la región de bisagra y los dominios C_{H2} y C_{H3}, o (b) los dominios C_{H1}, de bisagra, C_{H2} y C_{H3}, de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas bi-específicas, las inmunoadhesinas se construyen como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, dichas inmunoglobulinas construidas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen la IgG, la IgD y la IgE. En las inmunoglobulinas de mayor peso molecular se repite una unidad de cuatro cadenas; IgM existe de forma general como un pentámero de cuatro unidades básicas unidas mediante puentes de disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso de un multímero, las cuatro unidades pueden ser iguales o diferentes.

A continuación se ilustran esquemáticamente varios ejemplos de inmunoadhesinas construidas dentro del alcance de la presente memoria:

(a) AC_L-AC_L;

(b) AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-AC_H);

20 (c) AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, o V_LC_L-V_HC_H)

(d) AC_L-V_HC_H-(AC_H, or AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-AC_H);

(e) V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, o V_LC_L-AC_H); y

(f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

donde cada A representa secuencias de aminoácido de adhesina idénticas o diferentes:

25 V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero mayor que 1;

30 Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

Por brevedad, las anteriores estructuras solo muestran las características clave; no indican la unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces de disulfuro. Sin embargo, cuando dichos dominios son requeridos para la actividad de unión, deben construirse para estar presentes en las localizaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

35 Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de tal modo que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina de cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre la bisagra y el dominio C_{H2}, como entre los dominios C_{H2} y C_{H3}. Se han publicado construcciones similares, Hoogenboom et al., *Mol. Immunol.* 28: 1027-1037 (1991).

40 Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es obligatoria en las inmunoadhesinas de la presente invención, podría haber presente una cadena ligera de inmunoglobulina asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina, o directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina típicamente es co-expresado con el ADN que codifica la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina. Con la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina ligados mediante puentes de disulfuro. Los métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 4.816.567, presentada el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen de la forma más conveniente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción de adhesina en estructura a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también se puede usar la fusión a fragmentos de inmunoglobulina genómica (véase, p.ej., Aruffo et al., *Cell* 61: 1303-1313 (1990); y Stamenkovic et al., *Cell* 66: 1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNcs que codifican las regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislarse en base a secuencias publicadas procedentes de bibliotecas de ADNc derivadas de bazo o de linfocitos de sangre periférica, mediante hibridación o mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los ADNcs que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plásmido que dirige la expresión eficiente en las células hospedantes seleccionadas.

10 D. Vectores, células hospedantes y métodos recombinantes

La invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido variante como el descrito en la presente memoria, vectores y células hospedantes que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido variante.

15 Para la producción recombinante del polipéptido variante, el ácido nucleico que lo codifica es aislado e insertado en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el polipéptido variante se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p.ej., usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican el polipéptido variante). Se dispone de muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento 20 potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

El polipéptido variante de esta invención puede ser producido de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que preferiblemente es una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de ruptura específico en el extremo-N de la proteína o polipéptido maduro. La 25 secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es tal que es reconocida y procesada (es decir, se rompe mediante una señal peptidasa) por la célula hospedante. Para células hospedantes procarióticas que no reconocen y procesan la secuencia señal de polipéptido variante nativa, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o líderes de enterotoxina II termo-estable. Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa puede ser sustituida, p.ej., por el líder de invertasa de levadura, líder de factor α (que incluyen los líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), 30 o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de célula de mamífero, se dispone de secuencias señal de mamífero, así como de líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD de herpes simple.

El ADN para dicha región precursora está ligado en el marco de lectura a, ADN que codifica el polipéptido variante.

35 (ii) Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedantes seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación dicha secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedante, e incluye orígenes de replicación o secuencias autónomamente replicantes. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo debido a que contiene el promotor temprano).

45 (iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p.ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, p.ej., el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos. 50

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedante. Aquellas células que son transformadas con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y por tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

55 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para procesar el ácido nucleico del polipéptido variante, tal como DHFR,

timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

5 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR son identificadas primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedante apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

10 Alternativamente, células hospedantes (particularmente hospedantes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el polipéptido variante, la proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden ser seleccionadas mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, p.ej., canamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de EE.UU. n° 4.965.199.

15 Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de célula hospedante de levadura proporciona entonces un entorno efectivo para la detección de la transformación a través del crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

20 Adicionalmente, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 pueden usarse para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Alternativamente, se ha publicado un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). También se han descrito vectores de expresión multi-copia para secreción de albúmina de suero humano recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(iv) Componente de promotor

30 Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedante y que está ligado operativamente al ácido nucleico del polipéptido variante. Los promotores adecuados para uso con hospedantes procarióticos incluyen el promotor *phoA*, β -lactamasa y sistemas de promotor de lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el polipéptido variante.

35 Se conocen secuencias promotoras para eucariotes. Virtualmente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente entre 25 y 30 bases por encima del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia observada entre 70 y 80 bases por encima del inicio de la transcripción de muchos genes es una región de CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificadora. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucarióticos.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedantes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

45 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradadoras asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. De forma ventajosa, también se usan potenciadores de levadura con promotores de levadura.

55 La transcripción de polipéptido variante a partir de vectores en células de hospedante de mamífero es controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de gripe aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y, lo más preferiblemente, virus de simio 40 (SV40), procedentes de promotores de mamífero heterólogos, p.ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedante.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen de forma conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírica del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedantes mamíferos usando el virus de papiloma bovino como vector se describe en la Patente de EE.UU. n° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de EE.UU. n° 4.601.978. Véase también Reyes et al., *Nature* 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa procedente de virus de herpes simple. Alternativamente, se puede usar como promotor la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous.

(v) *Componente de elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido variante de esta invención mediante eucariontes superiores a menudo es incrementada insertando una secuencia potenciadora en el vector. Hoy día se conocen muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 sobre el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma del lado posterior del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador puede dividirse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificadora de polipéptido variante, pero preferiblemente está localizado en un sitio 5' respecto al promotor.

(vi) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedantes eucarióticas (células de levadura, hongos, insecto, planta, animal, humano o nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se encuentran disponibles habitualmente en regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el polipéptido variante. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la presente memoria.

(vii) *Selección y transformación de células hospedantes*

Las células hospedantes adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria son células de procarionte, levadura o eucarionte superior descritas anteriormente. Los procariontes adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, p.ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p.ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p.ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p.ej., *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedante de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas, tal como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos, más que limitantes.

Además de los procariontes, también los microbios eucarióticos, tal como hongos filamentosos o levaduras, son hospedantes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptido variante. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es la utilizada más habitualmente entre los microorganismos hospedantes eucarióticos. Sin embargo, se dispone habitualmente de una serie de otros géneros, especies y cepas, que son útiles en la presente memoria, tal como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedantes de *Kluyveromyces* tales como, p.ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, p.ej. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedantes de *Aspergillus* tal como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedantes adecuadas para la expresión de polipéptido variante glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células hospedantes de insecto permisivas de hospedantes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Se dispone públicamente de una variedad de cepas víricas para transfección, p.ej., la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como virus de la presente memoria, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como hospedantes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el mayor interés está en las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares de hospedante mamífero útiles son la línea de CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., **J. Gen Virol.** 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77: 4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, **Biol. Reprod.** 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., **Annals N.Y. Acad. Sci.** 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedantes son transformadas con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptido variante, y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospedantes

Las células hospedantes usadas para producir el polipéptido variante de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedantes. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., **Meth. Enz.** 58: 44 (1979), Barnes et al., **Anal. Biochem.** 102: 255 (1980), Patentes de EE.UU. n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Re. de Patente de EE.UU. 30.985, se pueden usar como medio de cultivo para las células hospedantes. Cualquiera de estos medios puede ser suplementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tal como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, cálcico, magnésico y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina), antibióticos (tal como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente energética equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a la concentración apropiada, según el conocimiento de los especialistas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tal como temperatura, pH, y similares, son las usadas previamente con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el especialista en la técnica.

(ix) Purificación de polipéptido variante

Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido variante puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido variante es producido intracelularmente, como una primera etapa, los restos particulados, tanto de células hospedantes como de fragmentos lisados, son eliminados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., **BioTechnology** 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Resumidamente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 minutos. Los restos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. Cuando el polipéptido variante es secretado al medio, los sobrenadantes procedentes de dichos sistemas de expresión generalmente son concentrados primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes inesperados.

La composición del polipéptido variante preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de purificación preferida la cromatografía de afinidad. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el polipéptido variante. La proteína A puede usarse para purificar polipéptidos variantes basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark et al., **J. Immunol. Meth.** 62: 1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., **EMBO J.** 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad casi siempre es agarosa, pero también existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tal como vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten mayores velocidades de flujo y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el polipéptido variante comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas de purificación de proteínas tal como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de sílice, cromatografía de heparina SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y

precipitación de sulfato amónico, también se encuentran disponibles dependiendo del polipéptido variante a recuperar.

Después de una(s) etapa(s) de purificación preliminar(es), la mezcla que comprende el polipéptido variante de interés y los contaminantes puede someterse a una cromatografía de interacción hidrofóbica a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente llevada a cabo a bajas concentraciones de sal (p.ej., de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

E. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido variante se preparan para almacenamiento mezclando el polipéptido variante que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (**Remington's Pharmaceutical Sciences** 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabén; catecol; resorcinol; ciclohexano; 3-pentanol y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofóbicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG).

La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que esté siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en **Remington's Pharmaceutical Sciences** 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar en administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el polipéptido variante, matrices que están en la forma de artículos conformados, p.ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el acetato de etilen-vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden contemplar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se pueden lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

F. Usos no terapéuticos para el polipéptido variante

El polipéptido variante puede usarse como agente de purificación por afinidad. En este proceso, el polipéptido variante se inmoviliza sobre una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido variante inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el antígeno a purificar, que está ligado al polipéptido variante inmovilizado.

Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno del polipéptido variante.

El polipéptido variante también puede ser útil en ensayos diagnósticos, p.ej., para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero.

5 Para aplicaciones diagnósticas, el polipéptido variante típicamente estará marcado con un resto detectable. Se dispone de numerosas etiquetas que pueden agruparse de forma general en las siguientes categorías:

10 (a) Radioisótopos, tal como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I . El polipéptido variante puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en **Current Protocols in Immunology**, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) por ejemplo, y la radioactividad se puede medir usando recuento de centelleo.

(b) Se dispone de marcas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansyl, lissamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse al polipéptido variante usando las técnicas descritas en **Current Protocols in Immunology** (ver arriba), por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar usando un fluorímetro.

15 (c) Se dispone de diversas marcas enzima-sustrato y la Patente de EE.UU. n° 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de las mismas. El enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. De forma alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen arriba. El sustrato quimioluminiscente se vuelve excitado electrónicamente a través de una reacción química y entonces puede emitir luz que se puede medir (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasa (p.ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de EE.UU. n° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (p.ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a 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, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

30 Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (p.ej., ortofenilén diamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametil bencidina hidrocloreuro (TMB));

(ii) Fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico;

35 (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (p.ej., p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -galactosidasa.

Los especialistas en la técnica disponen de otras numerosas combinaciones enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véanse las Patentes de EE.UU. n° 4.275.149 y 4.318.980.

40 Algunas veces, la etiqueta está conjugada indirectamente con el polipéptido variante. El especialista en la técnica es consciente de varias técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el polipéptido variante puede estar conjugado con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas mencionadas antes puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y de este modo la etiqueta se puede conjugar con el polipéptido variante de este modo indirecto. Alternativamente, para lograr una conjugación indirecta de la etiqueta con el polipéptido variante, el polipéptido variante se conjuga con un hapteno pequeño (p.ej., digoxina) y uno de los diferentes tipos de etiquetas mencionado antes se conjuga con un polipéptido variante anti-hapteno (p.ej., anticuerpo anti-digoxina). De esta manera, se puede lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el polipéptido variante.

En otra realización de la invención, el polipéptido variante no necesitar estar marcado, y la presencia del mismo se puede detectar usando un anticuerpo marcado que se une al polipéptido variante.

50 El polipéptido variante de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos o indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, **Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques**, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

El polipéptido variante también puede usarse para ensayos diagnósticos *in vivo*. Generalmente, el polipéptido variante es marcado con un radionucleido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de tal modo que el antígeno o las células que lo expresan pueden ser localizados usando inmunocentellografía.

G. Usos *in vivo* del polipéptido variante

Se contempla que el polipéptido variante de la presente invención pueda usarse para tratar un mamífero, p.ej., un paciente que padece, o que está predispuesto a, una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la administración del polipéptido variante. Las afecciones que pueden ser tratadas con el polipéptido variante son muchas e incluyen cáncer (p.ej., donde el polipéptido variante se une al receptor HER2, CD20 o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)); afecciones alérgicas tales como asma (con un anticuerpo anti-IgE); y trastornos mediados por LFA-1 (p.ej., cuando el polipéptido variante es un anticuerpo anti-LFA-1 o anti-ICAM-1), etc.

Cuando el anticuerpo se une al receptor HER2, el trastorno preferiblemente es cáncer que expresa HER2, p.ej. un tumor benigno o maligno que se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2. Dichos cánceres incluyen, aunque sin limitación, cáncer de mama, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Según lo mostrado en la presente memoria, se puede preparar un polipéptido con una región Fc variante que presenta una actividad de ADCC mejorada, o disminuida. Dichas moléculas tendrán aplicación en el tratamiento de diferentes trastornos.

Por ejemplo, el polipéptido variante con actividad de ADCC mejorada puede emplearse en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que se desee la destrucción o eliminación de tejido o de microorganismos extraños. Por ejemplo, el polipéptido se puede usar para tratar cáncer; trastornos inflamatorios; infecciones (p.ej., infecciones bacterianas, víricas, fúngicas o de levadura); y otras afecciones (tales como bocio) en las que se desea la eliminación de tejido, etc.

Cuando el polipéptido variante presenta una actividad de ADCC disminuida, dichas variantes pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos en los que se desea un polipéptido que contiene región Fc con una larga vida media, pero el polipéptido preferiblemente no presenta función(es) efectora(s) no deseada(s). Por ejemplo, el polipéptido que contiene región Fc puede ser un anticuerpo anti-factor de tejido (TF); un anticuerpo anti-IgE; y un anticuerpo anti-integrina (p.ej., un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$). El mecanismo deseado de acción de dichos polipéptidos que contienen región Fc puede ser bloquear pares de unión ligando-receptor. Además, el polipéptido que contiene región Fc con actividad de ADCC disminuida puede ser un anticuerpo agonista.

El polipéptido variante se administra mediante cualquier medio adecuado, que incluye la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresivo, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Adicionalmente, el polipéptido variante se administra de forma adecuada mediante infusión de pulsos, particularmente con dosis declinantes del polipéptido variante. Preferiblemente, la dosificación se realiza mediante inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del polipéptido variante dependerá del tipo de enfermedad a tratar, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el polipéptido variante es administrado con fines preventivos o terapéuticos, de terapias previas, del historial clínico del paciente y de la respuesta del paciente al polipéptido variante, y del criterio del médico responsable. El polipéptido variante se administra de forma adecuada de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosificación inicial candidata para administración al paciente del polipéptido variante es de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 15 mg/kg (p.ej., 0,1-20 mg/kg), tanto, por ejemplo, para una administración única o para más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, también pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

La composición de polipéptido variante se formulará, dosificará y administrará de un modo consistente con la correcta práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero concreto que va a ser tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el calendario de administración, y otros factores conocidos por los practicantes de medicina. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del polipéptido variante a administrar estará gobernada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad o trastorno. El polipéptido variante, aunque no tiene porqué, está formulado opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de polipéptido variante presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores discutidos anteriormente. Generalmente, éstos se usan en las mismas dosificaciones

y con las mismas rutas de administración usadas aquí anteriormente o aproximadamente entre el 1 y el 99% de las dosificaciones empleadas con anterioridad.

La invención se entenderá más completamente en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben considerarse como limitativos del alcance de esta invención.

5 Ejemplo 1

Ensayo de unión de receptor de baja afinidad

Este ensayo determina la unión de una región Fc de IgG a subunidades α de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA recombinantes expresadas como proteínas de fusión marcadas con His6-glutamina S transferasa (GST). Puesto que la afinidad de la región Fc de IgG1 por el Fc γ RI se encuentra en el rango nanomolar, la unión de las variantes de Fc de IgG1 se puede medir valorando IgG monomérica y midiendo la IgG ligada con un anti-IgG policlonal en un formato ELISA estándar (Ejemplo 2, a continuación). Sin embargo, la afinidad de los otros miembros de la familia Fc γ R, es decir, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA, por IgG se encuentra en el rango micromolar, y la unión de IgG1 monomérica a estos receptores no se puede medir con fiabilidad en un formato ELISA.

El siguiente ensayo utiliza variantes de Fc de E27 anti-IgE recombinante (Figuras 4A y 4B) que, cuando se mezcla con IgE humana en una ratio molar 1:1, forma un hexámero estable que consiste en tres moléculas anti-IgE y tres moléculas de IgE. Se diseñó una forma quimérica recombinante de IgE (IgE quimérica) que consiste en una región Fc de IgE humana y el Fab de un anticuerpo anti-VEGF (Presta et al. *Cancer Research* 57: 4593-4599 (1997)) que se une a dos moléculas de VEGF por mol de anti-VEGF. Cuando se añade VEGF humano recombinante en una ratio molar 2:1 a los hexámeros quiméricos de IgE:E27, los hexámeros se unen formando complejos de mayor peso molecular a través de la interacción de VEGF:Fab de IgE quimérica. El componente E27 de este complejo se une a las subunidades α de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA con mayor avidez, para permitir la detección en un formato ELISA.

Materiales y métodos

Disposición de receptores: se expresaron subunidades α de receptor de Fc γ como fusiones GST de dominios extracelulares (ECDs) marcados con His6 en células 293 dando como resultado una proteína de fusión ECD-6His-GST (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-74 (1977) y Gorman et al., *DNA Prot. Eng. Tech.* 2: 3-10 (1990)) y se purificó mediante cromatografía de columna Ni-NTA (Qiagen, Australia) y se cambió de tampón a salino tamponado con fosfato (PBS). Se determinaron las concentraciones mediante absorción a 280 nm usando coeficientes de extinción derivados del análisis de composición de aminoácidos. Los receptores fueron dispuestos sobre placas Nunc F96 maxisorb (n° de cat. 439454) a 100 ng por pocillo añadiendo 100 μ L de fusión receptor-GST a 1 μ g/mL en PBS y se incubaron durante 48 horas a 4°C. Antes del ensayo, las placas fueron lavadas 3x con 250 μ L de tampón de lavado (PBS, pH 7,4, que contenía 0,5% de TWEEN 20™) y bloqueados con 250 μ L de tampón de ensayo (salino tamponado con Tris 50 mM, 0,05% de TWEEN20™, 0,5% de albúmina bovina de grado RIA (Sigma A7888), y EDTA 2 mM, pH 7,4).

Formación de complejo inmune: se añaden cantidades molares iguales (1:1) de E27 e IgE quimérica recombinante, que se une a dos moles de VEGF humano recombinante por mol de IgE quimérica, a un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm en PBS y se mezcla mediante rotación durante 30 minutos a 25°C. Los hexámeros de E27 (anti-IgE)/IgE quimérica (IgE) se forman durante esta incubación. El VEGF humano recombinante (forma 165, PM 44.000) se añade en una ratio molar 2:1 a la concentración de IgE y se mezcla mediante rotación otros 30 minutos adicionales a 25°C. La unión VEGF-IgE quimérica enlaza hexámeros E27:IgE quimérica para formar complejos de mayor peso molecular, que se unen a las placas recubiertas de ECD de subunidad α de Fc γ R a través de la región Fc del anticuerpo E27.

E27:IgE quimérica:VEGF: se añaden complejos (ratio molar 1:1:2) a placas recubiertas de subunidad α de Fc γ R a concentraciones de E27 de 5 μ g y 1 μ g de IgG total por cuadruplicado en tampón de ensayo y se incubaron durante 120 minutos a 25°C en un agitador orbital.

Detección de complejo: las placas fueron lavadas 5x con tampón de lavado para eliminar los complejos no ligados y la unión de IgG se detectó mediante la adición de 100 μ L de peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a anti-cadena pesada específica (γ) de IgG humana de cabra (Boehringer Mannheim 1814249) a 1:10.000 en tampón de ensayo y se incubó durante 90 minutos a 25°C en un agitador orbital. Las placas fueron lavadas 5x con tampón de lavado para eliminar HRP de cabra anti-IgG humana y el anti-IgG ligado es detectado añadiendo 100 μ L de disolución sustrato (0,4 mg/mL de dihidrocloruro de O-fenilendiamina, Sigma P6912, H₂O₂ 6 mM en PBS) e incubando durante 8 minutos a 25°C. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de 100 μ L de H₂SO₄ 4,5 N y el producto colorimétrico se mide a 490 nm en un densitómetro de placa de 96 pocillos (Molecular Devices). La unión de complejos de variante E27 se expresa como un porcentaje del complejo que contiene E27 natural.

55 Ejemplo 2

Identificación de sitios de unión únicos de C1q en anticuerpo de IgG humano

En el presente estudio, se identificaron mutaciones en el dominio CH2 de un anticuerpo de IgG1 humano, "C2B8" (Reff et al., *Blood* 83: 435 (1994)), que suprimió la unión del anticuerpo a C1q pero no alteró la conformación del anticuerpo ni afectó a la unión a cada uno de los FcγRs. Mediante mutagénesis de escaneo de alanina, se identificaron cinco variantes en IgG1 humana, D270K, D270V, K322A, P329A y P331, que fueron no líticas y presentaron una unión disminuida a C1q. Los datos sugirieron que los sitios de unión a C1q centrales en IgG1 humana son diferentes a los de IgG2b murina. Adicionalmente, se observó que K322A, P329A y P331A se unen de forma normal al antígeno CD20, y a los cuatro receptores de Fc, FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn.

Materiales y métodos

Construcción de variantes de C2B8: Se usaron las cadenas quiméricas ligera y pesada del anticuerpo anti-CD20 C2B8 (Reff et al., *Blood* 83: 435 (1994)) subclonadas por separado en vectores PRK descritos previamente (Gorman et al., *DNA Protein Eng. Tech.* 2: 3 (1990)). Mediante mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488 (1987)), se construyeron variantes de escaneo de alanina de la región Fc en la cadena pesada. Los plásmidos de cadena pesada y ligera fueron co-transfectados en una línea celular embrionaria humana transformada con adenovirus, como se ha descrito previamente (Werther et al., *J. Immunol.* 157: 4986 (1996)). El medio se cambió a libre de suero 24 horas después de la transfección y se recolectó el anticuerpo secretado después de cinco días. Los anticuerpos fueron purificados usando Proteína A-SEPHAROSE CL-4B™ (Pharmacia), se cambió el tampón y se concentró a 0,5 mL con PBS usando una Centricon-30 (Amicon), y se almacenó a 4°C. Se determinó la concentración de anticuerpo usando ELISA de unión a Ig.

ELISA de unión a C1q: Se recubrieron placas de 96 pocillos Costar durante una noche a 4°C con las concentraciones indicadas de C2B8 en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato sódico 0,05 M), pH 9. A continuación las placas fueron lavadas 3x con PBS/ 0,05% de TWEEN 20™, pH 7,4, y bloqueadas con 200 µL de diluyente ELISA sin timerosal (NaPO₄ 0,1M / NaCl 0,1M / 0,1% de gelatina / 0,05% de TWEEN 20™ / 0,05% de ProClin300) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con tampón de lavado, se añadió una alícuota de 100 µL de 2 µg/mL de C1q (Quidel, San Diego, CA) a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación la placa se lavó 6x con tampón de lavado. Se añadió a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:1000 de anticuerpo conjugado anti-complemento de peroxidasa C1q de oveja (Biodesign) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó nuevamente 6x con tampón de lavado y se añadió a cada pocillo 100 µL de tampón de sustrato (PBS/0,012% de H₂O₂) que contenía OPD (dihidrocloruro de O-fenilendiamina (Sigma)). La reacción de oxidación, observada a través de la aparición de un color amarillo, se dejó evolucionar durante 30 minutos y se detuvo mediante la adición de 100 µL de H₂SO₄ 4,5 N. A continuación se leyó la absorbancia a (492-405) nm usando un lector de microplaca (SPECTRA MAX 250™, Molecular Devices Corp.). Se ejecutaron los controles apropiados en paralelo (es decir, se llevó a cabo el ELISA sin C1q para cada concentración de C2B8 usada y también se llevó a cabo el ELISA sin C2B8). Para cada variante, se midió la unión a C1q representando la absorbancia a (492-405) nm frente a la concentración de C2B8 en µg/mL usando un programa de ajuste de curva de 4 parámetros (KALEIDAGRAPH™) y comparando los valores de EC₅₀.

Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (ADCC): Este ensayo se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito previamente (Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)). Se diluyeron varias concentraciones de C2B8 (0,08-20 µg/mL) con tampón de RHB (RPMI 1640/HEPES 20 mM (pH 7,2)/Glutamina 2 mM(0,1% de BSA/100 µg/mL de Gentamicina). Se diluyó complemento humano (Quidel) 1:3 en tampón RHB y células WIL2-S (disponibles en ATCC, Manassas, VA) que expresan el antígeno CD20 fueron diluidas hasta una densidad de 1×10^6 células/mL con tampón RHB. Se añadieron mezclas de 150 µL que contenían volúmenes iguales de C2B8, complemento humano diluido y células WIL2-S a una placa de 96 pocillos de cultivo de tejidos de fondo plano y se dejó incubar durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por complemento. A continuación se añadieron 50 µL de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo y se incubó durante una noche a 37°C. Se midió la absorbancia usando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Tal como describen Gazzano-Santoro et al., los resultados se expresan en unidades de fluorescencia relativas (RFU). Las concentraciones de muestra se calcularon a partir de una curva de calibrado CDB8 y para cada variante se presenta el porcentaje de actividad en comparación con C2B8 natural.

Potencia de unión a CD20 de las variantes de C2B8: La unión de C2B8 y variantes al antígeno CD20 se determinó mediante un método descrito previamente (Reff et al., (1994), ver anterior; revisado en Gazzano-Santoro et al., (1996), ver anterior). Se crecieron células WIL2-S durante 3-4 días hasta una densidad celular de 1×10^6 células/mL. Las células fueron lavadas y giradas dos veces en tampón FACS (PBS/0,1% de BSA/0,02% de NaN₃) y se resuspendieron hasta una densidad celular de 5×10^6 células/mL. Se añadieron 200 µL de células (5×10^6 células/mL) y 20 µL de muestras de C2B8 diluido a un tubo de 5 mL y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. A continuación la mezcla se lavó con 2 mL de tampón FACS frío, se precipitó mediante centrifugación y se resuspendió en 200 µL de tampón FACS frío. A la suspensión, se añadieron 10 µL de anti-IgG humana-FITC de cabra (American Qualex Labs.) y la mezcla se incubó a oscuras a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Tras la incubación, la mezcla se lavó con 2 mL de tampón FACS, se precipitó mediante centrifugación y se resuspendió en 1 mL de tampón fijador frío (1% de formaldehído en PBS). Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo y los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia relativas (RFU) frente a las concentraciones de anticuerpo usando un programa de ajuste de curvas de 4 parámetros (KALEIDAGRAPH™). Los valores de EC₅₀ se presentan como un porcentaje del material de referencia de C2B8.

ELISAs de unión a FcγR: la fusión subunidad α de FcγRI-GST se extendió sobre placas maxisorb Nunc F96 (n° cat. 439454) añadiendo 100 μL de fusión receptor-GST a 1 μg/mL en PBS y se incubó durante 48 horas a 4°C. Antes del ensayo, las placas fueron lavadas 3x con 250 μL de tampón de lavado (PBS, pH 7,4, que contenía 0,5% de TWEEN 20™) y se bloqueó con 250 μL de tampón de ensayo (salino tamponado con Tris 50 mM, 0,05% de TWEEN 20™, 0,5% de albúmina bovina de grado RIA (Sigma A7888), y EDTA 2 mM pH 7,4). Las muestras diluidas a 10 μg/mL en 1 mL de tampón de ensayo son añadidas a las placas recubiertas de subunidad α de FcγRI y se incuban durante 120 minutos a 25°C en un agitador orbital. Las placas se lavan 5x con tampón de lavado para eliminar los complejos no ligados y la unión a IgG se detecta añadiendo 100 μL de anti-IgG (γ) humana específica de cadena pesada, de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Boehringer Mannheim 1814249) a 1:10.000 en tampón de ensayo y se incubó durante 90 minutos a 25°C en un agitador orbital. Las placas son lavadas 5x con tampón de lavado para eliminar el anti-IgG humana de cabra HRP no ligado y el anti-IgG ligado se detecta añadiendo 100 μL de disolución sustrato (0,4 mg/mL de dihidrocloruro de O-fenilendiamina, Sigma P6912, H₂O₂ 6 mM en PBS) y se incubó durante 8 minutos a 25°C. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de 100 μL de H₂SO₄ 4,5 N y el producto colorimétrico se mide a 490 nm en un densitómetro de placa de 96 pocillos (Molecular Devices). La unión de la variante se expresa como un porcentaje de la molécula natural.

Se llevaron a cabo ELISAs de unión a FcγRII y III como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.

Para medir la actividad de unión a FcRn de las variantes de IgG, se recubrieron placas ELISA con 2 μg/mL de estreptavidina (Zymed, South San Francisco) en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4°C durante una noche y se bloquearon con PBS-0,5% de BSA, pH 7,2 a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió a la placa FcRn biotinilado (preparado usando biotina-X-NHS de Research Organics, Cleveland, OH, y usado a 1-2 μg/mL) en PBS-0,5% de BSA, 0,05% de polisorbato 20, pH 7,2, y se incubó durante una hora. Dos diluciones en serie a la mitad de patrón de IgG (1,6-100 ng/mL) o de variantes en PBS-0,5% de BSA, 0,05% de polisorbato 20, pH 6,0, fueron añadidas a la placa y se incubaron durante dos horas. La IgG ligada fue detectada usando F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra marcado con peroxidasa en el tampón anterior de pH 6,0 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) seguido de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirgaard & Perry Laboratories) como sustrato. Las placas fueron lavadas entre etapas con PBS-0,05% de polisorbato 20 a pH 7,2 o 6,0. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Se ajustaron las curvas de valoración con un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Se calcularon las concentraciones de las variantes de IgG correspondientes a la absorbancia de punto medio de la curva de valoración del patrón y a continuación se dividieron por la concentración del patrón correspondiente a la absorbancia del punto medio de la curva de valoración de patrón.

Resultados y discusión

Mediante mutagénesis de escaneo de alanina, se construyeron varias mutaciones puntuales individuales en el dominio CH2 de C2B8 comenzando con E318A, K320A y K322A. Todas las variantes construidas se ligaron de forma normal al antígeno de CD20 (Tabla 3).

Tabla 3

	wt (natural)	E318A	K320A	*K322A	*P329A	P331A
FcRn	+	+	+	+		
CD20	+	+	+	+	+	+
FcγRI	+	+	+	+	+	+
FcγRII	+	+	+	+	+	+
FcγRIII	+	+	+	+	+	+
**C1q	+++	++	+++	-	-	-
CDC	+	+	+	-	-	-

(+) indica unión y (-) significa supresión de la unión.

** Con respecto a la unión de C1q, cada signo + es equivalente a aproximadamente un 33% de unión.

* no según la invención.

Cuando se analizó la unión de complemento humano a un anticuerpo con un Fc humano, la capacidad de E318A y K320A para activar el complemento fue esencialmente idéntica a la de C2B8 natural (Tabla 3). Cuando se compara con C2B8 natural, parece que hay poca diferencia en la unión de E318A y K320A a C1q. Solo hay un 10% de disminución en la unión de K320A y aproximadamente un 30% de disminución en la unión de E318A a C1q (Fig. 2). Los resultados indican que el efecto de la sustitución de E318A y K320A sobre la activación de complemento y la unión de C1q es mínimo. Asimismo, la IgG1 humana de C2B8 fue sustituida por IgG2 humana y se usó como control negativo en los estudios de unión a C1q. La variante de IgG2 parece tener mucha menor afinidad por C1q que las

variantes E318A y K320A (Fig. 2). Por tanto, los resultados demuestran que E318 y K320 no constituyen los sitios de unión a C1q nucleares para la IgG1 humana. Inversamente, la sustitución K322A presentó un efecto significativo tanto sobre la actividad de complemento como sobre la unión a C1q. La variante de K322A no presentó actividad de CDC cuando se evaluó en el anterior ensayo de CDC y fue más de 100 veces inferior al C2B8 natural en unión a C1q (Fig. 2). En el sistema humano, K322 es el único residuo de los sitios de unión a C1q nucleares propuestos que resultó tener un efecto significativo sobre la activación de complemento y la unión a C1q.

Puesto que el estudio de Duncan y Winter se llevó a cabo usando IgG2b de ratón y los anteriores resultados revelan que K320 y E318 en la IgG1 humana no están implicados en la unión a C1q, y sin pretender establecer ninguna teoría, los datos anteriores sugieren que la región de unión a C1q en las IgGs murinas es diferente a las humanas. Para profundizar en este aspecto, y también para identificar variantes adicionales que no se unen a C1q y por tanto no activan complemento, se construyeron varias mutaciones puntuales adicionales en las proximidades de K322, determinadas mediante la estructura tridimensional de la Fc de C2B8. Las variantes construidas, K274A, N276A, Y278A, S324A, P329A, P331A, K334A y T335A, fueron evaluadas en términos de capacidad de unión a C1q y también para activar complemento. Muchas de estas sustituciones tuvieron poco o ningún efecto sobre la unión a C1q o la activación de complemento. En los anteriores ensayos, las variantes P329A y P331A no activaron complemento y presentaron una unión reducida a C1q. La variante P331A no activó complemento y fue 60 veces inferior a la unión a C1q (Fig. 3) cuando se compara con el C2B8 natural (Fig. 2). El rango de concentración de los anticuerpos variantes usados en la Fig. 3 se expande a 100 µg/mL a fin de observar la saturación de la unión a C1q a la variante P331A. La mutación P329A da como resultado un anticuerpo que no activa complemento y que es más de 100 veces inferior en unión a C1q (Fig. 3) en comparación con el C2B8 natural (Fig. 2).

Las variantes que no se unieron a C1q y que por tanto no activan complemento cuando se examinan en términos de capacidad de unión a los receptores de Fc: FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcRn. Este estudio concreto se llevó a cabo usando un anticuerpo anti-IgE humanizado, un anticuerpo de IgG1 con dichas mutaciones (véase el Ejemplo 1 anterior). Los resultados revelaron que las variantes, K322A y P329A, se unen a todos los receptores de Fc en la misma medida que la proteína natural (Tabla 4). Sin embargo, se produjo una pequeña disminución en la unión de P331A a FcγRIIB.

En conclusión, se identificó que dos sustituciones de aminoácido en la región terminal COOH del dominio CH2 de la IgG1 humana, K322A y P329A, dan como resultado una reducción de más de 100 veces en la unión a C1q y que no activan la ruta de CDC. Estas dos variantes, K322A y P329A, se unen a todos los receptores de Fc con la misma afinidad que el anticuerpo natural. En base a los resultados, resumidos en la Tabla 4, y sin pretender establecer ninguna teoría, se propone que el epicentro de la unión a C1q de la IgG1 humana está centrado alrededor de K322, P329 y P331 y es diferente del epicentro de la IgG2b murina, que constituyen E318, K320 y K322.

Tabla 4

	wt (natural)	E318A	K320A	*K322A	*P329A	P331A
CD20	100	89	102	86	112	103
^a FcγRI	100	93	102	90	104	74
^a FcγRIIA	100	113	94	109	111	86
^a FcγRIIB	100	106	83	101	96	58
^a FcγRIII	100	104	72	90	85	73
CDC	100	108	108	nada	nada	nada

^a Para la unión a los FcγRs las variantes se prepararon en el fondo de E27 (anti-IgE). Los resultados se presentan como porcentaje del natural.

* no según la invención.

Se identificó un residuo adicional implicado en la unión a C1q humano usando los métodos descritos en el presente ejemplo. El residuo D270 fue reemplazado por lisina y valina para generar las variantes D270K y D270V, respectivamente. Estas variantes mostraron ambas un descenso en la unión a C1q humano (Fig. 6) y fueron no líticas (Fig. 7). Las dos variantes ligaron el antígeno CD20 de forma normal y reclutaron ADCC.

Ejemplo 3

Variantes con unión a C1q mejorada

El siguiente estudio demuestra que la sustitución de residuos en las posiciones K326, A327, E333 y K334 dio como resultado variantes con al menos aproximadamente un 30% de incremento en la unión a C1q cuando se compara con el anticuerpo natural. Esto indicó que K326, A327, E333 y K334 son sitios potenciales para mejorar la eficacia de anticuerpo a través de la ruta de CDC. El objetivo de este estudio fue mejorar la actividad de CDD de un

anticuerpo aumentando la unión a C1q. Mediante mutagénesis sitodirigida en K326 y E333, se construyeron varias variantes con unión mejorada a C1q. Los residuos en orden de unión incrementada a en K326 son K<V<E<A<G<D<M<W, y los residuos en orden de unión incrementada en E333 son E<Q<D<V<G<A<S. Se construyeron cuatro variantes, K326M, K326D, K326E y E333S con un incremento de al menos dos veces en la unión a C1q con respecto al tipo natural. La variante K326W presentó un incremento de aproximadamente cinco veces en la unión a C1q.

Las variantes del anticuerpo C2B8 natural se prepararon como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Un anticuerpo de control adicional, C2B8 natural, producido en células de ovario de hámster chino (CHO) esencialmente como se describe en la Patente de EE.UU. 5.736.137, se incluyó en un ELISA de unión a C1q para confirmar que el C2B8 wt producido en la línea celular renal 293 tenía la misma actividad de unión a C1q que el anticuerpo producido en CHO (véase "CHO-wt-C2B8" en la Fig. 8). El ELISA de unión a C1q, el ensayo de CDC y el ensayo de potencia de unión a CD20 de este ejemplo se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

Tal como se muestra en la Fig. 8, la sustitución de alanina en K326 y E333 en C2B8 dio como resultado variantes con aproximadamente un 30% de incremento en la unión a C1q.

Se construyeron otras varias variantes de punto individual en K326 y E333 y se evaluaron en términos de su capacidad para unirse a C1q y activar complemento. Todas las variantes construidas se ligaron de forma normal al antígeno CD20.

Con respecto a K326, las otras variantes de punto individual construidas fueron K326A, K326D, K326E, K326G, K326V, K326M y K326W. Tal como se muestra en la Fig. 9, estas variantes se ligaron todas a C1q con mejor afinidad que el anticuerpo natural. K326W, K326M, K326D y K326E mostraron un aumento de al menos dos veces en la unión a C1q (Tabla 5). Entre las variantes de K326, la K326W presentó la mejor afinidad por C1q.

Tabla 5

Variante	Valor EC ₅₀
Natural ("Wild type")	1,53
K326V	1,30
K326A	1,03
K326E	1,08
K326G	0,95
K326D	0,76
K326M	0,67
K326W	0,47
E333S	0,81
E333A	0,98
E333G	1,14
E333V	1,18
E333D	1,22
E333Q	1,52
K334A	1,07

Las sustituciones con residuos hidrofóbicos y cargados dieron como resultado variantes con unión a C1q incrementada. Incluso la sustitución con glicina, que se sabe que confiere flexibilidad a una cadena y está bien conservada en la naturaleza, dio como resultado una variante con una mayor afinidad por C1q en comparación con el tipo natural. Parecería que cualquier sustitución de aminoácido en este sitio daría como resultado una variante con mayor afinidad por C1q. Según se ha determinado a través de la estructura tridimensional, K326 y E333 están en las proximidades de los sitios de unión a C1q nucleares (Fig. 10).

Además de por alanina, E333 también fue sustituido por otros residuos de aminoácido. Estas variantes, E333S, E333G, E333V, E333D y E333Q, presentaron todas un aumento de la unión a C1q en comparación con el tipo natural (Fig. 11). Tal como se muestra en la Tabla 5, el orden de afinidad de unión a C1q fue como se indica a continuación: E333S>E333A>E333G>E333V>E333D>E333Q. Las sustituciones con residuos de aminoácido con volúmenes de cadena lateral pequeños, es decir, serina, alanina y glicina, dieron como resultado variantes con

mayor afinidad por C1q en comparación con las otras variantes, E333V, E333D y E333Q, de mayores volúmenes de cadena lateral. La variante E333S presentó la mayor afinidad por C1q, presentando un aumento de dos veces en la unión con respecto al tipo natural. Sin pretender establecer ninguna teoría, esto indica que el efecto sobre la unión a C1q en 333 también puede ser debido en parte a la polaridad del residuo.

- 5 También se generaron variantes dobles. Tal como se muestra en las Figs. 12 y 13, las variantes dobles K326M-E333S y K326A-E333A fueron al menos tres veces mejores en la unión a C1q humano que el C2B8 natural (Fig. 12) y al menos dos veces mejores en mediar en la CDC con respecto al C2B8 natural (Fig. 13). La aditividad indica que éstas son variantes que actúan de forma independiente.

- 10 Tal como se muestra en la Fig. 14, se preparó una variante adicional con unión a C1q mejorada (50% de aumento) cambiando A327 de una región constante de IgG1 humana por glicina. Inversamente, en una región constante de IgG2 humana, el cambio de G327 a alanina redujo la unión a C1q del anticuerpo de IgG2.

Ejemplo 4

Identificación de los sitios de unión a FcR en anticuerpos de IgG humanos

- 15 En el presente estudio, se evaluó el efecto de mutar varios residuos de la región Fc de un anticuerpo de IgG1 con respecto a la unión a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA, así como a FcRn. Se identificaron las variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada y reducida.

Materiales y métodos

- 20 **Construcción de variantes de IgG1:** E27 anti-IgE recombinante que tiene las secuencias de cadena ligera y cadena pesada de las Figuras 4A y 4B, respectivamente, se usó como anticuerpo original en los siguientes experimentos. Este anticuerpo se une al antígeno de IgE y tiene una región Fc de IgG1 de alotipo no A. Mediante mutagénesis sitodirigida (Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488 (1987)), se construyeron variantes de la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo original anterior. Se co-transfectaron los plásmidos de cadena pesada y ligera en una línea celular embrionaria humana transformada con adenovirus como se ha descrito previamente (Werther et al., *J. Immunol.* 157: 4986 (1996)). Se cambió el medio a libre de suero 24 horas después de la transfección y se recolectó el anticuerpo secretado después de cinco días. Los anticuerpos fueron purificados mediante Proteína G SEPHAROSE® (Pharmacia), se cambió el tampón y se concentró hasta 0,5 mL con PBS usando una Centricon-30 (Amicon), y se almacenó a 4°C. La concentración se determinó mediante adsorción a 280 nm usando coeficientes de extinción derivados del análisis de composición de aminoácidos.

- 30 **ELISA de unión a FcγRIA de alta afinidad:** Se expresó FcγRIA como una fusión GST de dominio extracelular marcado con His6 en células 293 y se purificó mediante cromatografía en columna de Ni-NTA.

- 35 Para purificar el FcγRIA, el sobrenadante de las células 293 transfectadas fue eliminado después de tres días. Se añadieron inhibidores de proteasa; 50 μL de aprotinina (Sigma)/ 50 mL de sobrenadante, y PMSF (1 mM). Los sobrenadantes fueron concentrados hasta 10 mL en una célula agitada (Amicon), y se dializaron durante una noche a 4°C contra 1 litro de tampón de columna (Tris 50 mM, pH 8,0, Imidazol 20 mM, NaCl 300 mM). Se realizó una diálisis adicional a la mañana siguiente contra tampón de columna fresco durante 4 horas a 4°C. La disolución se cargó en una columna de 1 mL de Ni⁺⁺ (resina de superflujo NTA, Qiagen) equilibrada previamente con 10 mL de tampón de columna. Las columnas se lavaron con 10 mL de tampón de columna, y se eluyó la proteína con 2,5 mL de tampón de elución (Tris 50 mM pH 8,0, imidazol 250 mM, NaCl 300 mM). La proteína se concentró hasta 0,5 mL y se cambió el tampón a PBS. Se determinaron las concentraciones mediante adsorción a 280 nm usando un coeficiente de extinción derivado del análisis de composición de aminoácidos.

- 45 Los receptores purificados fueron extendidos sobre placas maxisorb Nunc F96 (n° cat. 439545) a aproximadamente 150 ng por pocillo añadiendo 100 μL de receptor a 1,5 μg/mL en PBS y se incubó durante 24 horas a 4°C. Antes del ensayo, las placas fueron lavadas 3x con 250 μL de tampón de lavado (salino tamponado con fosfato pH 7,4, que contenía 0,5% de TWEEN 20®) y se bloqueó con 250 μL de tampón de ensayo (salino tamponado con Tris 50 mM, 0,05% de TWEEN 20®, 0,5% de albúmina bovina de grado RIA (Sigma A7888), y EDTA 2 mM, pH 7,4).

- Se añadieron 100 μL de E27 a los primeros cuatro pocillos de la placa recubierta con subunidad de FcγRIA a una concentración de 10 μg/mL. Se añadieron 80 μL de tampón de ensayo a los siguientes cuatro pocillos, seguido de 20 μL de la IgG de E27 a 10 μg/mL para dar lugar a una concentración final de 2 μg/mL. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 2 horas en un agitador orbital.

- 50 Para la detección, las placas fueron lavadas 5x con tampón de lavado para eliminar el anticuerpo no ligado. Se detectó la unión de IgG a GST-FcγRIA añadiendo 100 μL de proteína G conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) (BIORAD) a 1:5000. Los conjugados de HRP fueron incubados durante 1,5 horas a 25°C en un agitador orbital. Las placas se lavaron 5x con tampón de lavado para eliminar el conjugado de HRP no ligado. La unión se detectó añadiendo 100 μL de disolución de sustrato (0,4 mg/mL de dihidrocloruro de O-fenilendiamina, Sigma P6912, H₂O₂ 6 mM en PBS) e incubando durante 10 minutos a 25°C. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100

μL de H_2SO_4 4,5 N y el producto colorimétrico se midió a 490 nm en un densitómetro de placa de 96 pocillos (Molecular Devices).

La unión de las variantes de E27 a una concentración de IgG de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se expresó como la ratio respecto al tipo natural de E27.

- 5 **Ensayo de THP-1 de Fc γ RIA:** Se añadieron 100 μL de E27 a los primeros tres pocillos de una placa de serocluster (Costar) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de ensayo (1x PBS, 0,1% de BSA, 0,01% de NaN_3). Se añadieron 92,5 μL de tampón de ensayo a los siguientes tres pocillos, seguido de 7,5 μL de la IgG de E27 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para dar lugar a una concentración final de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A cada pocillo se añadieron 100 μL de THP-1 a una concentración de 5 millones de células/mL en tampón de ensayo FACS. La placa se incubó en hielo durante 30 minutos.

10 Para la detección, las células se lavaron 2x con tampón de ensayo para eliminar el anticuerpo no ligado. Se detectó IgG ligada a Fc γ RIA añadiendo 100 μL de fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ conjugado a FITC de anti-cadena pesada específica de IgG humana (Jackson ImmunoResearch) a 1:200. Los conjugados de FITC se incubaron con células durante 30 minutos en hielo. Las células fueron lavadas x3 con tampón de ensayo para eliminar conjugado de FITC no ligado. Las células se tiñeron con P.I. (SIGMA) a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizaron mediante citometría de flujo.

15 La unión de variantes de E27 a una concentración de IgG de 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se expresó como una ratio respecto al tipo natural de E27.

Los datos del ensayo de placa (ELISA de Fc γ RIA) y del ensayo basado en célula (ensayo THP-1 de Fc γ RIA) se promediaron para obtener una actividad de unión a Fc γ RIA.

- 20 **ELISA de unión a Fc γ R de baja afinidad:** Se llevaron a cabo ELISAs de unión a Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, con detección del hexámero estable (que consiste en tres moléculas anti-IgE y tres moléculas de IgE).

ELISA de unión a FcRn: Para medir la actividad de unión a FcRn de las variantes de IgG, se recubrieron placas ELISA con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina (Zymed, South San Francisco) en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4°C durante una noche y se bloqueó con PBS-0,5% de BSA, pH 7,2, a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió a la placa FcRn biotilado (preparado usando biotina-X-NHS de Research Organics, Cleveland, OH, y usado a 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS-0,5% de BSA, 0,05% de polisorbato 20, pH 7,2, y se incubó durante una hora. Se añadieron a la placa diluciones en serie a la mitad de patrón de IgG (1,6-100 ng/mL) o de variantes en PBS-0,5% de BSA, 0,05% de polisorbato 20, pH 6,0, y se incubó durante dos horas. La IgG ligada fue detectada usando $\text{F}(\text{ab}')_2$ de cabra marcado con peroxidasa anti- $\text{F}(\text{ab}')_2$ de IgG humana en el anterior tampón de pH 6,0 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) seguido de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirgaard & Perry Laboratories) como sustrato. Las placas fueron lavadas entre etapas con PBS-0,05% de TWEEN 20® a pH 7,2 o 6,0. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Se ajustaron curvas de valoración con un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Se calcularon las concentraciones de variantes de IgG correspondientes a la absorbancia de punto medio de la curva de valoración de calibrado y a continuación se dividieron por la concentración del patrón correspondiente a la absorbancia de punto medio de la curva de valoración de calibrado.

Ensayo de ADCC in vitro: para preparar células diana marcadas con 51, se crecieron líneas de células tumorales en placas de cultivo de tejido y se recolectaron usando EDTA 10 mM estéril en PBS. En todos los ensayos se usaron como dianas células SK-BR-3, una línea celular de cáncer de mama humano que sobreexpresa 3+ HER2. Las células desprendidas fueron lavadas dos veces en medio de cultivo celular. Las células (5×10^6) se marcaron con 200 μCi de cromo 51 (New England Nuclear/DuPont) a 37°C durante una hora con mezcla ocasional. Las células marcadas fueron lavadas tres veces con el medio de cultivo celular, a continuación se resuspendieron hasta una concentración de 1×10^5 células/mL. Las células fueron usadas sin opsonización, o fueron opsonizadas antes del ensayo mediante incubación con rhuMAb HER2 natural (HERCEPTIN®) o siete mutantes de Fc (G14, G18, G17, G36, G30, G31 y G34) a 100 ng/mL y 1,25 ng/mL en el ensayo de PBMC o 20 ng/mL y 1 ng/mL en el ensayo de NK.

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica tomando muestras de sangre en heparina de donantes sanos normales y mediante dilución con un volumen igual de salino tamponado con fosfato (PBS). A continuación la sangre se extendió en capas sobre LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM® (LSM: Organon Teknika) y se centrifugó según las instrucciones del fabricante. Las células mononucleares fueron recolectadas de la interfaz LSM-plasma y se lavaron tres veces con PBS. Las células efectoras fueron suspendidas en medio de cultivo celular hasta una concentración final de 1×10^7 células/mL.

Tras purificación a través de LSM, las células asesinas naturales (NK) fueron aisladas de las PBMCs mediante selección negativa usando un kit de aislamiento de células NK y una columna magnética (Miltenyi Biotech) según las instrucciones del fabricante. Se recolectaron las células NK aisladas, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo hasta una concentración de 2×10^6 células/mL. La identidad de las células NK fue confirmada mediante análisis de citometría de flujo.

5 Se prepararon ratios variables de efector:diana mediante dilución en serie de las células efectoras (tanto PBMC como NK) a la mitad a lo largo de las filas de una placa de microtitulación (volumen final de 100 µL) en medio de cultivo celular. La concentración de células efectoras osciló entre $1,0 \times 10^7$ /mL y $2,0 \times 10^4$ /mL para PBMC y entre $2,0 \times 10^6$ /mL y $3,9 \times 10^3$ /mL para NK. Tras la valoración de las células efectoras, se añadieron a cada pocillo de la placa 100 µL de células diana marcadas con cromo 51 (opsonizadas o no opsonizadas) a 1×10^5 células/mL. Esto dio como resultado una ratio inicial efector:diana de 100:1 para células PBMC y de 20:1 para células NK. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, y cada placa contenía controles tanto para lisis espontánea (sin células efectoras) como para lisis total (células diana más 100 µL de dodecil sulfato sódico al 1%, hidróxido sódico 1 N). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 horas, tras lo cual se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular usando un sistema de recolección de sobrenadante (Skatron Instrument, Inc.) y se contabilizaron en un contador gamma Minaxi auto-gamma 5000 series (Packard) durante un minuto. Los resultados se expresaron entonces como porcentaje de citotoxicidad usando la fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = (\text{cpm muestra} - \text{lisis espontánea}) / (\text{lisis total} - \text{lisis espontánea}) \times 100$$

A continuación se usó un ajuste de curva de cuatro parámetros para evaluar los datos (KaleidaGraph 3.0.5).

15 Resultados

Se generó una variedad de variantes de anticuerpo que tenían una actividad de unión a FcR que difería del anticuerpo original. Los datos de unión a FcR correspondientes a las variantes generadas se muestran a continuación en las Tablas 6 y 7. Una variante adicional, T307Q, también presentó una unión a FcRn mejorada en comparación con el anticuerpo original E27.

Tabla 6

VARIANTES DE DOMINIO CH2

IG2	Res nº EU (Kabat)	FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIIB		FcγRI IIIA				
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd		
UNIÓN REDUCIDA A TODOS LOS FcγR														
1	233-236 ELLG > 0,54 PVA-	0,54	(0,20)	3	0,12	(0,06)	6	0,08	(0,01)	0,12	(0,01)	0,04	(0,02)	n=2
2*	P238A(251)	1,49	(0,17)	3	0,60	(0,05)	5	0,38	(0,14)	0,36	(0,15)	0,07	(0,05)	n=4
14	D265A(278)	1,23	(0,14)	4	0,14	(0,04)	6	0,07	(0,01)	0,13	(0,05)	0,09	(0,06)	n=4
17	E269A(282)	1,05		6	0,52	(0,03)	6	0,65	(0,18)	0,75	(0,29)	0,45	(0,13)	n=5
18	D270A(283)	1,05		6	0,76	(0,12)	6	0,06	(0,01)	0,11	(0,05)	0,14	(0,04)	n=5
58	N297A(314)	0,80	(0,18)	8	0,15	(0,06)	7	0,05	(0,00)	0,10	(0,02)	0,03	(0,01)	n=3
52	A327Q(346)	0,97		7	0,63	(0,15)	7	0,13	(0,03)	0,14	(0,03)	0,06	(0,01)	n=4
64*	P329A(348)	0,80		6	0,48	(0,10)	6	0,08	(0,02)	0,12	(0,08)	0,21	(0,03)	n=4
UNIÓN REDUCIDA A FcγRII Y FcγRIII														
3	S239A(252)	1,06		7	0,81	(0,09)	7	0,73	(0,25)	0,76	(0,36)	0,26	(0,08)	n=3
33	E294A(311)	0,75		4	0,90	(0,08)	4	0,87	(0,19)	0,63	(0,17)	0,66	(0,14)	n=5
34	Q295A(312)	0,79		4	1,00	(0,11)	4	0,62	(0,20)	0,50	(0,24)	0,25	(0,09)	n=5
39	V303A(322)	1,26	(0,21)	3	0,91	(0,11)	5	0,86	(0,10)	0,65	(0,17)	0,33	(0,09)	n=8

UNIÓN MEJORADA A FcyrII Y FcyrIII														
11	T256A(269)	1,91	(0,43)	6	1,14	(0,14)	4	1,41	(0,27)	2,06	(0,66)	1,32	(0,18)	n=9
30	K290A(307)	0,79	(0,14)	3	1,01	(0,08)	4	1,29	(0,21)	1,40	(0,18)	1,28	(0,21)	n=7
44	D312A(331)	1,50	(0,06)	4	1,01	(0,12)	5	1,20	(0,24)	1,19	(0,07)	1,23	(0,14)	n=3
51	K326A(345)	1,03			1,04	(0,05)	4	1,26	(0,21)	1,49	(0,27)	1,22	(0,28)	n=5
197	A330(349)K				1,28			1,28		1,25		1,28		n=1
273	A339(359)T				1,23			1,11		1,23		1,42		n=1
EFECTO DE FcyrII														
10	R255A(268)	0,59	(0,19)	4	1,26	(0,26)	8	1,30	(0,20)	1,59	(0,42)	0,98	(0,18)	n=5
12	E258A(271)	1,18			1,18	(0,13)	4	1,33	(0,22)	1,65	(0,38)	1,12	(0,12)	n=5
15	S267A(280)	1,08			1,20	(0,14)	4	1,64	(0,18)	2,06	(0,35)	1,14	(0,25)	n=7
16	H268A(281)	1,02	(0,22)	3	1,05	(0,11)	4	1,22	(0,14)	1,45	(0,23)	0,52	(0,09)	n=12
19	E272A (285)	1,34	(0,24)	4	1,04	(0,06)	4	1,24	(0,11)	1,58	(0,19)	0,74	(0,12)	n=4
21	N276A(289)	1,15	(0,21)	3	1,05	(0,14)	4	1,29	(0,20)	1,34	(0,40)	0,95	(0,04)	n=4
23	D280A(295)	0,82			0,97	(0,06)	4	1,34	(0,14)	1,60	(0,31)	1,09	(0,20)	n=10
25	E283A(300)	0,71			0,97	(0,03)	4	1,24	(0,23)	1,20	(0,17)	1,01	(0,14)	n=5
26	H285A(302)	0,85			0,96	(0,07)	4	1,26	(0,12)	1,23	(0,15)	0,87	(0,04)	n=4
27	N286A(303)	1,24	(0,04)	2	0,94	(0,20)	13	1,28	(0,23)	1,39	(0,14)	1,03	(0,08)	n=5
31	R292A (309)	0,81	(0,18)	4	0,93	(0,02)	4	0,27	(0,14)	0,18	(0,07)	0,90	(0,18)	n=9

36	S298A(317)	0,80	1,10	(0,04)	3	0,40	(0,08)	0,21	(0,11)	1,30	(0,18)	n=12
38	R301A(320)	0,86	1,06	(0,10)	4	1,12	(0,12)	1,26	(0,14)	0,21	(0,08)	n=6
38B	R301M(320)	0,88	1,06	(0,12)	4	1,29	(0,17)	1,56	(0,12)	0,48	(0,21)	n=4
40	V305A(324)	1,46	1,04	(0,19)	10	1,12	(0,12)	1,23	(0,22)	0,84	(0,15)	n=4
41	T307A(326)	1,81	0,99	(0,14)	4	1,19	(0,37)	1,35	(0,33)	1,12	(0,18)	n=12
42	L309A(328)	0,63	0,93	(0,18)	6	1,13	(0,08)	1,26	(0,12)	1,07	(0,20,)	n=3
45	N315A(334)	0,76	1,27	(0,14)	3	1,15	(0,06)	1,30	(0,17)	1,07	(0,21)	n=5
48	K320A(339)	1,10	0,98	(0,09)	5	1,12	(0,11)	1,22	(0,05)	0,87	(0,17)	n=4
49*	K322A(341)	0,98	0,94	(0,05)	6	1,15	(0,11)	1,27	(0,24)	0,61	(0,14)	n=5
50	S324A(343)	1,08	0,98	(0,05)	4	0,82	(0,22)	0,70	(0,12)	1,12	(0,17)	n=4
65	P331A(350)	0,85	1,29	(0,34)	8	1,29	(0,14)	1,47	(0,28)	1,03	(0,19)	n=3
54	E333A(352)	1,03	0,98	(0,15)	5	0,92	(0,12)	0,76	(0,11)	1,27	(0,17)	n=10
56	T335A(354)	0,98	0,98	(0,05)	4	0,79	(0,22)	0,65	(0,26)	0,92	(0,54)	n=3
57	S337A(356)	1,03	1,17	(0,23)	3	1,22	(0,30)	1,26	(0,06)	0,94	(0,18)	n=4
EFECTO DE FcyRIII												
5	K248A(261)	0,87	0,95	(0,05)	5	1,06	(0,12)	1,01	(0,12)	0,71	(0,05)	n=4
6	D249A(262)	0,93	1,04	(0,10)	4	1,02	(0,12)	0,94	(0,02)	0,66	(0,07)	n=5
7	M252A(265)	0,64	0,99	(0,13)	4	1,01	(0,18)	1,15	(0,22)	0,65	(0,17)	n=6
9	S254A(267)	< 0,10	0,96	(0,08)	4	0,97	(0,24)	1,15	(0,38)	0,73	(0,14)	n=3

16	H268A(281)	1,02	(0,22)	3	1,05	(0,11)	4	1,22	(0,14)	1,45	(0,23)	0,52	(0,09)	n=12
19	E272A(285)	1,34	(0,24)	4	1,04	(0,06)	4	1,24	(0,11)	1,58	(0,19)	0,74	(0,12)	n=4
22	Y278A(291)	0,90			0,96	(0,02)	4	1,11	(0,08)	1,1,0	(0,16)	0,67	(0,11)	n=4
29	T289A(306)	0,86			0,93	(0,03)	4	0,96	(0,33)	0,83	(0,22)	0,62	(0,19)	n=7
32	E293A(310)	0,85			1,11	(0,07)	4	1,08	(0,19)	1,07	(0,20)	0,31	(0,13)	n=6
35	Y296F(313)	0,79			1,07	(0,12)	4	0,97	(0,26)	0,84	(0,18)	0,52	(0,09)	n=5
36	S298A(317)	0,80			1,10	(0,04)	3	0,40	(0,08)	0,21	(0,11)	1,30	(0,18)	n=12
38	R301A(320)	0,86			1,06	(0,10)	4	1,12	(0,12)	1,26	(0,14)	0,21	(0,08)	n=6
38B	R301M(320)	0,88			1,06	(0,12)	4	1,29	(0,17)	1,56	(0,12)	0,48	(0,21)	n=4
49*	K322A(341)	0,98			0,94	(0,05)	6	1,15	(0,11)	1,27	(0,24)	0,61	(0,14)	n=5
54	E333A(352)	1,03	(0,01)	2	0,98	(0,15)	5	0,92	(0,12)	0,76	(0,11)	1,27	(0,17)	n=10
55	K334A(353)	1,05	(0,03)	2	1,10	(0,06)	4	1,01	(0,15)	0,90	(0,12)	1,39	(0,19)	n=17
NO EFECTO SOBRE FcYR														
4	K246A(259)	1,03			0,94	(0,06)	4	1,02	(0,10)	0,92	(0,15)	1,14	(0,38)	n=4
4B	K246M(259)	0,69			0,83	(0,05)	5	0,83	(0,06)	0,76	(0,05)	0,95	(0,09)	n=3
5B	K248M(261)	0,79			0,95	(0,06)	4	0,89	(0,09)	0,83	(0,04)	1,01	(0,23)	n=3
8	I253A(266)	< 0,10			0,96	(0,05)	4	1,14	(0,02)	1,18	(0,06)	1,08	(0,14)	n=3
13	T260A(273)	1,09			0,93	(0,09)	4	0,89	(0,14)	0,87	(0,10)	0,89	(0,08)	n=4
20	K274A(287)	1,18			1,02	(0,04)	4	0,86	(0,09)	0,96	(0,10)	1,11	(0,08)	n=3

24	V282A(299)	1,13	(0,07)	2	0,96	(0,02)	4	1,15	(0,13)	1,15	(0,20)	1,00	(0,18)	n=4
28	K288A(305)	0,38	(0,12)	5	0,88	(0,15)	15	1,15	(0,26)	1,14	(0,20)	1,06	(0,04)	n=4
37	Y300F(319)	0,74	(0,10)	2	1,07	(0,15)	4	1,11	(0,04)	1,09	(0,09)	1,01	(0,10)	n=3
43	Q311A(330)	1,62	(0,25)	4	0,93	(0,05)	4	1,11	(0,06)	1,19	(0,13)	0,93	(0,17)	n=3
46	K317A(336)	1,44	(0,18)	4	0,92	(0,17)	6	1,13	(0,05)	1,18	(0,27)	1,10	(0,23)	n=4
47	E318A(337)	0,85			0,92	(0,07)	4	1,04	(0,10)	1,17	(0,23)	1,01	(0,05)	n=3
53	A330Q(349)	0,76			0,96	(0,10)	4	1,01	(0,12)	1,02	(0,02)	0,75	(0,18)	n=3

Tabla 7

VARIANTES DE DOMINIO CH3

IG2	Res nº EU (Kabat)	FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRI IIIA	
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.
B1	K338(358)A	1,14		3	0,90 (0,05)	3	0,78 (0,09)	0,63 (0,08)		0,15 (0,01)	n=2
B1A	K338(358)M	0,78		3	0,99 (0,08)	3	0,99 (0,13)	0,93 (0,15)		0,49 (0,04)	n=2
B2	K340(360)A	1,02		3	1,04 (0,07)	3	1,05 (0,18)	0,96 (0,20)		0,84 (0,11)	n=2
B2A	K340(360)M	1,20		3	1,17 (0,11)	3	1,10 (0,12)	1,20 (0,19)		0,75 (0,12)	n=2
B3	Q342(363)A	1,09		3	1,13 (0,11)	3	1,01 (0,10)	1,09 (0,23)		0,98 (0,10)	n=2
B4	R344(365)A	0,77		3	1,04 (0,08)	3	0,89 (0,14)	0,91 (0,04)		0,97 (0,07)	n=4
B5	E345(366)A	1,18		3	1,06 (0,05)	3	1,03 (0,10)	0,98 (0,10)		0,97 (0,13)	n=4
B6	Q347(368)A	0,95		3	1,04 (0,06)	3	1,00 (0,03)	0,92 (0,02)		1,04 (0,12)	n=4
B7	R355(376)A	1,06		3	1,09 (0,07)	3	0,84 (0,09)	0,87 (0,11)		0,98 (0,09)	n=4
B8	E356(377)A	1,21	(0,11)	2	1,05 (0,04)	3	0,90 (0,02)	0,99 (0,13)		0,92 (0,03)	n=3
B9	M358(381)A	0,96		3	1,06 (0,07)	3	1,11 (0,06)	1,16 (0,25)		0,91 (0,09)	n=3
B10	T359(382)	1,04		3	1,04 (0,05)	3	1,13 (0,10)	1,15 (0,04)		1,23 (0,26)	n=3
B11	K360(383)A	1,30	(0,08)	4	1,02 (0,04)	3	1,12 (0,10)	1,12 (0,08)		1,23 (0,16)	n=6
B12	N361(384)A	1,16		3	1,00 (0,03)	3	0,82 (0,07)	0,82 (0,12)		1,08 (0,06)	n=3
B13	Q362(385)A	1,25	(0,24)	3	1,00 (0,04)	3	1,03 (0,10)	1,02 (0,03)		1,03 (0,16)	n=4
B14	Y373(396)A	0,86		3	0,98 (0,07)	3	0,84 (0,11)	0,75 (0,08)		0,67 (0,04)	n=5
B15	S375(398)A	1,17	(0,19)	5	0,95 (0,02)	3	1,08 (0,06)	1,14 (0,11)		1,04 (0,05)	n=6
B16	D376(399)A	1,45	(0,36)	4	1,00 (0,05)	3	0,80 (0,16)	0,68 (0,14)		0,55 (0,10)	n=5
B17	A378(401)Q	1,32	(0,13)	3	1,06 (0,05)	3	1,40 (0,17)	1,45 (0,17)		1,19 (0,17)	n=5
B18	E380(405)A	2,19	(0,29)	6	1,04 (0,06)	3	1,18 (0,01)	1,07 (0,05)		0,92 (0,12)	n=2
B19	E382(407)A	1,51	(0,18)	4	1,06 (0,03)	3	0,95 (0,11)	0,84 (0,04)		0,76 (0,17)	n=3
B20	S383(408)A	0,74		3	1,03 (0,03)	3	0,92 (0,04)	0,94 (0,05)		0,88 (0,07)	n=3
B21	N384(410)A	0,88		3	1,00 (0,01)	3	1,05 (0,19)	1,10 (0,18)		0,96 (0,18)	n=8

IG2	Res n° EU (Kabat)	FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIIA				
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd		
B22	Q386(414)A	0,70	(0,10)	2	1,14	(0,08)	3	1,08	(0,13)	1,19	(0,25)	0,98	(0,14)	n=9
B23	E388(416)A	0,64	(0,12)	2	1,15	(0,09)	3	0,87	(0,03)	0,94	(0,09)	0,62	(0,04)	n=3
B24	N389(417)A	0,73		3	1,00	(0,02)	3	0,98	(0,15)	0,81	(0,04)	0,75	(0,02)	n=3
B25	N390(418)A	0,87		3	1,06	(0,04)	3	0,99	(0,10)	0,94	(0,02)	0,87	(0,09)	n=3
B26A	Y391(419)A	1,14		3	1,00	(0,08)	3	0,97	(0,10)	0,94	(0,02)	0,86	(0,05)	n=3
B26B	Y391(419)F	0,81	(0,10)	2	1,00	(0,01)	3	1,05	(0,12)	1,11	(0,08)	1,01	(0,15)	n=5
B27	K392(420)A	0,97		3	1,01	(0,08)	3	0,92	(0,20)	0,94	(0,01)	0,79	(0,22)	n=3
B28	L398(426)A	0,94	(0,04)	2	1,13	(0,15)	6	1,17	(0,11)	1,20	(0,08)	0,94	(0,04)	n=3
B29	S400(428)A	0,64	(0,07)	3	1,10	(0,09)	3	0,95	(0,04)	0,99	(0,08)	0,83	(0,07)	n=2
B30	D401(430)A	1,10	(0,09)	3	1,13	(0,16)	6	1,11	(0,12)	1,19	(0,11)	0,97	(0,10)	n=5
B31	D413(444)A	1,21	(0,07)	2	1,00	(0,01)	3	0,83	(0,08)	0,84	(0,06)	0,90	(0,16)	n=2
B32	K414(445)A	1,02		3	1,00	(0,04)	3	0,64	(0,15)	0,58	(0,18)	0,82	(0,27)	n=3
B33	S415(446)A	0,44		3	1,04	(0,03)	3	0,90	(0,11)	0,88	(0,05)	0,86	(0,18)	n=2
B34	R416(447)A	1,08		3	0,96	(0,04)	3	0,68	(0,05)	0,80	(0,05)	0,71	(0,08)	n=2
B35	Q418(449)A	0,77	(0,03)	2	0,98	(0,01)	3	1,00	(0,01)	0,96	(0,02)	0,96	(0,05)	n=2
B36	Q419(450)A	0,76	(0,01)	2	0,97	(0,02)	3	0,68	(0,09)	0,63	(0,07)	0,86	(0,08)	n=3
B37	N421(452)A	0,98		3	0,99	(0,01)	3	0,90	(0,03)	0,81	(0,0)	0,87	(0,12)	n=2
B38	V422(453)A	1,01		3	0,98	(0,02)	3	0,89	(0,0)	0,83	(0,05)	0,83	(0,12)	n=2
B39	S424(455)A	1,41	(0,14)	3	0,93	(0,03)	3	1,04	(0,06)	1,02	(0,02)	0,88	(0,09)	n=2
B40	E430(461)R	0,93	(0,03)	2	1,05	(0,02)	3	1,24	(0,11)	1,28	(0,10)	1,20	(0,18)	n=5
B41	H433(469)A	0,41	(0,14)	2	0,93	(0,03)	3	0,92	(0,18)	0,79	(0,18)	1,02	(0,15)	n=3
B42	N434(465)A	3,46	(0,37)	7	1,00	(0,04)	3	0,97	(0,07)	0,98	(0,13)	0,74	(0,12)	n=5
B43	H435(466)A	< 0,10	4	1,25	(0,09)	3	0,77	(0,05)	0,72	(0,05)	0,78	(0,03)	n=3	
B44	Y436(467)A	< 0,10	2	0,99	(0,02)	2	0,93	(0,05)	0,91	(0,06)	0,91	(0,15)	n=3	
B45	T437(468)A	0,99	(0,07)	3	1,00	(0,02)	3	1,12	(0,18)	1,00	(0,22)	0,77	(0,19)	n=5

IG2	Res nº EU (Kabat)	FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIIA				
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd		
B46	Q438(469)A	0,79	(0,05)	2	1,02	(0,05)	3	0,80	(0,10)	0,72	(0,16)	1,01	(0,17)	n=5
B47	K439(470)A	0,70	(0,04)	2	0,98	(0,04)	3	0,78	(0,16)	0,68	(0,22)	0,86	(0,19)	n=4
B48	S440(471)A	0,99			1,01	(0,02)	3	1,10	(0,15)	1,11	(0,26)	0,93	(0,01)	n=3
B49	S442(473)A	0,86			1,02	(0,02)	3	0,98	(0,08)	0,91	(0,11)	0,95	(0,10)	n=5
B50	S444(475)A	0,80			1,01	(0,02)	3	1,07	(0,03)	1,03	(0,03)	0,88	(0,12)	n=2
B51	K447(478)A	0,62	(0,12)	3	1,02	(0,03)	3	0,95	(0,05)	0,91	(0,05)	0,84	(0,09)	n=2

* no según la invención

ES 2 694 002 T3

5 Las variantes con unión incrementada a un FcyR generalmente presentaron valores de unión $\geq 1,20$, determinados en este Ejemplo, y los que tenían unión reducida a un FcyR generalmente presentaron valores de unión $\leq 0,80$, determinados en este Ejemplo. Las variantes con unión incrementada a FcRn generalmente presentaron valores $\geq 1,30$, determinados en este Ejemplo, y los que tenían unión reducida a FcRn generalmente presentaron valores $\leq 0,70$, determinados en este Ejemplo.

Aparte de las variantes de alanina, se prepararon varias variantes de sustitución que no eran de alanina, y la actividad de unión a FcR de dichas variantes se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 8

VARIANTES QUE NO SON DE ALANINA

IG2	Res nº EU (Kabat)	FcRn		FcyRI		FcyRIIA		FcyPIIB		FcyRIIIA	
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.
222	D249(262)E				0,97		0,99		0,84		n=1
176	T256(269)G				1,10	(0,03)	1,06	(0,07)	0,96	(0,27)	n=2
254	T256(269)N				1,03		0,89		1,13		n=1
157	D265(278)N				0,02	(0,01)	0,03	(0,01)	0,02	(0,01)	n=3
158	D265(278)E				0,11	(0,04)	0,03	(0,01)	0,02	(0,01)	n=3
189	S267(280)G			R131	1,21	(0,05)	0,97	(0,16)	0,09	(0,02)	n=3
				H131	0,59	(0,09)					n=3
84	H268(281)N				1,33		1,41		0,56		n=1
85	H268(281)S				1,35		1,38		0,81		n=1
87	H268(281)Y				1,19		1,29		0,76		n=1
168	E269(282)D				0,89	(0,10)	0,73	(0,07)	1,13	(0,21)	n=2
169	E269(282)Q				0,08	(0,01)	0,16	(0,00)	0,28	(0,03)	n=2
92	D270(283)N				0,06	(0,01)	0,10	(0,02)	0,04	(0,00)	n=2
93	D270(283)E				0,55	(0,05)	0,38	(0,05)	1,17	(0,01)	n=2
223	E272(285)Q				1,93		1,81		0,82		n=1
224	E272(285)N				0,43		0,23		0,50		n=1
167	K274(287)Q				0,86		0,94		0,62		n=1
165	N276(289)K				0,81		0,77		0,61		n=1
233	N276(289)Q				1,09		0,79		0,91		n=1
79	D280(295)N				1,26	(0,07)	1,38	(0,04)	1,13	(0,13)	n=2
149	D280(295)S				1,07	(0,06)	1,04	(0,08)	1,09	(0,06)	n=2
226	E283(300)Q				1,12		1,24		1,19		n=1
227	E283(300)S				1,03		1,07		0,85		n=1

IG2	Res n° EU (Kabat)	FcRn		FcyRI		FcyRIIA		FcyPIIB		FcyRIIIA		
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	med.	sd	med.
228	E283(300)N					1,18		1,28		0,94		n=1
229	E283(300)D					1,14		1,23		0,95		n=1
23	N286(303)Q					1,52		1,13		0,96		n=1
237	N286(303)S					1,72		1,38		1,32		n=1
238	N286(303)D					1,41		1,23		0,98		n=1
73	K290(307)Q					1,17		1,26		1,40		n=1
75	K290(307)S					1,27		1,34		1,26		n=1
77	K290(307)E				1,14	1,10		1,20		1,30		n=1
78	K290(307)R				1,25	1,05		1,15		1,08		n=1
177	K290(307)G					1,07		1,21		1,23		n=1
80	R292(309)K					0,71	(0,17)	0,75	(0,10)	1,15	(0,18)	n=3
81	R292(309)H					0,21	(0,09)	0,12	(0,01)	0,92	(0,08)	n=2
82	R292(309)Q					0,47	(0,12)	0,25	(0,06)	0,45	(0,09)	n=3
83	R292(309)N					0,54	(0,16)	0,29	(0,07)	0,88	(0,02)	n=3
144	E293(310)Q					0,85	(0,03)	0,77	(0,13)	0,99	(0,04)	n=2
145	E293(310)D					0,90	(0,02)	0,88	(0,07)	0,37	(0,07)	n=2
147	E293(310)K					1,13	(0,04)	1,31	(0,17)	0,72	(0,08)	n=4
173	E294(311)Q					1,01		0,95	0,84	0,84		n=1
174	E294(311)D					0,37		0,26	0,14	0,14		n=1
185	Y296(313)H					0,90		0,81	0,92	0,92		n=1
186	Y296(313)W					0,96		0,93		1,38		n=1
70	S298(317)G					0,87	(0,17)	0,63	(0,33)	0,46	(0,09)	n=4
71	S298(317)T					0,41	(0,21)	0,40	(0,19)	0,89	(0,20)	n=3
72	S298(317)N					0,08	(0,01)	0,16	(0,03)	0,06	(0,01)	n=2
218	S298(317)V					0,11	(0,06)	0,17	(0,01)	0,33	(0,19)	n=3

IG2	Res n° EU (Kabat)	FcRn		FcyRI		FcyRIIA		FcyPIIB		FcyRIIIA	
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	med.	sd
219	S298(317)L				1,14	(0,12)	1,42	(0,31)	0,34	(0,04)	n=3
150	V303(322)L				0,89	(0,05)	0,73	(0,10)	0,76	(0,09)	n=4
151	V303(322)T				0,64	(0,11)	0,34	(0,05)	0,20	(0,05)	n=4
217	E318(337)K				1,03		1,08		0,72		n=1
172	K320(339)R				0,71		0,66		0,68		n=1
202	K320(339)M				1,34		1,40		1,27		n=1
204	K320(339)Q				1,23		1,12		1,17		n=1
205	K320(339)F				1,29		1,34		1,12		n=1
235	K320(339)R				1,24		0,95		0,86		n=1
155 *	K322(341)R				0,87	(0,07)	0,87	(0,21)	0,92	(0,15)	n=3
156 *	K322(341)Q				0,87	(0,02)	0,92	(0,23)	0,78	(0,18)	n=3
206 *	K322(341)E				1,38		1,34		0,81		n=1
207 *	K322(341)N				0,57		0,36		0,04		n=1
213	S324(343)N				1,15		1,09		0,97		n=1
214	S324(343)Q				0,82		0,83		0,78		n=1
215	S324(343)K				0,66		0,37		0,77		n=1
216	S324(343)E				0,82		0,73		0,81		n=1
208	K326(345)S				1,44		1,62		1,37		n=1
209	K326(345)N				1,04		1,00		1,27		n=1
210	K326(345)Q				1,36		1,41		1,15		n=1
211	K326(345)D				1,68		2,01		1,36		n=1
212	K326(345)E				1,34	(0,27)	1,47	(0,33)	1,26	(0,04)	n=2
131	A327(346)S				0,23	(0,06)	0,22	(0,05)	0,06	(0,01)	n=4
159	A327(346)G				0,92	(0,09)	0,83	(0,10)	0,36	(0,05)	n=3
196	A330(349)D				0,18		0,08		0,07		n=1

IG2	Res n° EU (Kabat)	FcRn		FcyRI		FcyRIIA		FcyPIIB		FcyRIIIA		
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	med.	sd	med.
197	A330(349)K				1,28		1,28	1,25		1,28		n=1
198	P331(350)S				1,00		0,86			0,86		n=1
199	P331(350)N						0,65			0,23		n=1
200	P331(350)E					1,06	0,91			0,42		n=1
203	P331(350)K				0,94		0,71			0,33		n=1
141	E333(352)Q				0,70	(0,05)	0,64	(0,09)		1,10	(0,03)	n=2
142	E333(352)N				0,59	(0,04)	0,52	(0,07)		0,56	(0,10)	n=2
143	E333(352)S									0,94		n=1
152	E333(352)K									0,85	(0,14)	n=3
153	E333(352)R				0,75	(0,04)	0,66	(0,03)		0,84	(0,05)	n=2
154	E333(352)D									1,26	(0,04)	n=3
178	E333(352)G				0,87		0,76			1,05		n=1
179	K334(353)G				0,76	(0,08)	0,60	(0,13)		0,88	(0,22)	n=5
135	K334(353)R				1,15	(0,09)	1,33	(0,18)		0,68	(0,07)	n=5
136	K334(353)Q				1,08	(0,11)	1,10	(0,21)		1,31	(0,26)	n=7
137	K334(353)N				1,16	(0,11)	1,29	(0,30)		1,15	(0,16)	n=7
138	K334(353)S				1,01	(0,11)	1,03	(1,05)		1,19	(0,08)	n=3
139	K334(353)E				0,74	(0,15)	0,72	(0,12)		1,30	(0,09)	n=4
140	K334(353)D				0,51	(0,09)	0,40	(0,03)		1,13	(0,09)	n=4
190	K334(353)M						1,18			1,35		n=1
191	K334(353)Y						1,15			1,31		n=1
192	K334(353)W						1,16			1,07		n=1
193	K334(353)H						1,11			1,26		n=1
220	K334(353)V				1,13	(0,11)	1,09	(0,15)		1,34	(0,18)	n=3
221	K334(353)L				1,05		1,09			1,38		n=1

IG2	Res nº EU (Kabat)	FcRn		FcyRI		FcyRIIA		FcyPIIB		FcyRIIIA		
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	med.	sd	med.
171	T335(354)Q					0,86		0,79		0,84		n=1
194	T335(354)E					1,24		1,30		1,19		n=1
195	T335(354)K					1,19		1,14		1,30		n=1
273	A339(359)T				1,23	1,11		1,23		1,42		n=1

ES 2 694 002 T3

La siguiente tabla resume la actividad de unión a FcR de varias variantes de combinación.

Tabla 9
VARIANTES DE COMBINACIÓN

IG2	Res nº (Kabat)	EU	FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIIA	
			med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	n	med.
96	S267(280)A				1,41		1,72		0,84		n=1	
	H268(281)A											
134	E333(352)A				0,72	(0,08)	0,63	(0,13)	1,30	(0,12)	n=5	
	K334(353)A											
1059	T256(269)A				0,44	(0,03)	0,22	(0,04)	1,41	(0,06)	n=2	
	S298(317)A											
1051	T256(269)A				0,47	(0,01)	0,30	(0,03)	1,21	(0,26)	n=2	
	D280(295)A											
	S298(317)A											
	T307(326)A											
106	T256(269)A				0,11		0,08		0,90		n=1	
	D280(295)A											
107	R292(309)A											
	S298(317)A											
109	T307(326)A											
	S298(317)A				0,34	(0,05)	0,16	(0,08)	1,53	(0,24)	n=5	
110	E333(352)A											
	S298(317)A				0,41	(0,07)	0,19	(0,08)	1,62	(0,34)	n=6	
110	K334(353)A											
	S298(317)A				0,35	(0,13)	0,18	(0,08)	1,66	(0,42)	n=11	
246	E333(352)A											
	K334(353)A											
246	S267(280)A				1,62	(0,15)	2,01	(0,45)	1,04	(0,12)	n=2	
	E258(271)A											

IG2	Res nº (Kabat)	EU		FcRn		FcγRI		FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIIA		
		med.	sd	n	med.	sd	n	med.	sd	med.	sd	med.	sd	
247	S267(280)A R255(268)A							1,60	(0,18)	1,72	(0,13)	0,88	(0,07)	n=3
248	S267(280)A D280(295)A							1,54	(0,08)	1,96	(0,37)	1,13	(0,07)	n=2
250	S267(280)A E272(265)A							1,51	(0,13)	1,82	(0,32)	0,95	(0,05)	n=3
251	S267(280)A E293(310)A							1,67	(0,11)	1,85	(0,10)	0,92	(0,09)	n=3
264	S267 (280)A E258(271)A D280(295)A R255 (268)A							1,48	(0,12)	2,03	(0,30)	0,89	(0,04)	n=2
269	E380(405)A N434 (465)A	8,55	(0,94)	3				1,02	(0,07)	1,05	(0,11)	1,02		n=2
270	E380(405)A N434 (465)A T307(326)A	12,6	(1,7)					0,99	(0,06)	0,99	(0,11)	0,96		n=2
271	E380(405)A L309(328)A	1,01	(0,01)	2				0,98		1,04		0,92		n=1
272	N434(465)A K288(305)A	3,15	(0,42)	2				0,94	(0,11)	0,96	(0,17)	0,88		n=2

* no según la invención.

Discusión

Este estudio incluye un mapeo completo de la IgG1 humana para FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcRn humanos. Se llevó a cabo un escaneo de alanina de todos los aminoácidos de la Fc de IgG1 humana (dominios CH2 y CH3) expuestos a disolvente, en base a la estructura cristalina de la Fc humana (Deisenhofer, *Biochemistry* 20: 2361-2370 (1981)). Cada aminoácido expuesto en CH2 y CH3 fue cambiado individualmente a alanina y la IgG variante fue evaluada contra los cinco receptores humanos; todas las variantes fueron evaluadas usando IgG1 E27 anti-IgE humanizada como polipéptido original. FcγRI y FcRn son receptores de alta afinidad y la IgG monomérica pudo ser evaluada en los ensayos para estos dos receptores. FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA son receptores de baja afinidad y requirieron el uso de un complejo inmune. Por tanto, se usó un ensayo de tipo ELISA para FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA, en el que hexámeros pre-formados, que consistían en tres moléculas de E27 anti-IgE y tres moléculas de IgE, fueron ligados al FcγR y se usó Fc de IgG anti-humano-HRP o proteína G-HRP como reactivo de detección. Para incrementar la unión, dichos hexámeros podían ligarse en multímeros mediante la adición de VEGF humano (usando IgE anti-VEGF). Los hexámeros se ligaron al FcγR de baja afinidad de forma significativa mejor que los monómeros de IgG; los multímeros se ligaron mejor que los hexámeros (Figs. 15A y 15B). Se usaron los complejos hexaméricos, ya que éstos proporcionan una unión suficiente y requieren menos IgG. Los complejos formados usando otras combinaciones anticuerpo:antígeno también son reactivos posibles, siempre que el antígeno contenga al menos dos sitios de unión idénticos por molécula para el anticuerpo. A modo de ejemplo, VEGF contiene dos sitios de unión por dímero de VEGF para anti-VEGF A.4.6.1 (Kim et al., *Growth Factors* 7: 53 (1992) y Kim et al., *Nature* 362: 841 (1993)). Los multímeros VEGF:anti-VEGF también se ligaron a FcγRIIA y FcγRIIIA de baja afinidad (Figuras 16A y 16B).

Una vez realizado el escaneo de alanina completo, se encontraron varias clases de variantes de alanina. Algunas variantes exhibieron una unión reducida a todos los FcγR (G14, Fig. 17), mientras que otras variantes mostraron una unión reducida solo a un FcγR (G36, Fig. 17), una unión mejorada solo a un FcγR (G15, G54, G55, Fig. 17), o una reducción con un FcγR simultánea a una mejora con otro (G16, Fig. 17).

Las variantes de alanina individuales también se combinaron en una única región de Fc variante; p.ej., la combinación de S298(317)A con K334(353)A mejoró la unión a FcγRIIIA más que cualquiera de S298(317)A o K334(353)A por sí solos (Figuras 18A y B; y compárense las variantes 36, 55 y 109 en las Tablas 6 y 9) (los números de residuo entre paréntesis corresponden al índice EU de Kabat). De forma similar, la combinación de S298(317)A con E333(352)A mejoró la unión a FcγRIIIA más que cualquiera de S298(317)A o E333(352)A por sí solos (compárense las variantes 36, 54 y 107 de las Tablas 6 y 9).

También se evaluaron variantes de IgG seleccionadas en términos de su unión a FcγR transfectado en células de mamífero. La porción extracelular de cadena α del FcγRIIIA humano fue transfectada en células CHO usando un enlace de GPI, mientras que para FcγRIIB el receptor de longitud completa fue transfectado en células CHO. Para las variantes evaluadas, el patrón de unión a las células fue igual al patrón de unión en el ensayo proteína:proteína (ELISA) (Figuras 18A-B y 19A-B).

Una aplicación de estas variantes es mejorar la función efectora de ADCC de un anticuerpo. Esto se puede lograr modificando los aminoácidos de la región Fc en uno o más residuos, lo que conduciría a una mejora de la unión a FcγRIIIA. La unión mejorada a FcγRIIIA conduciría a una mejor unión a células NK, que portan solo FcγRIIIA y que pueden mediar en la ADCC. Se evaluaron variantes de alanina seleccionadas que reducen la unión a FcγRIIIA (variantes 17, 18, 34; Tabla 6), las que no tienen efecto sobre la unión a FcγRIIIA (variante 31, Tabla 6), o las que presentaron una mejora en la unión a FcγRIIIA (variantes 30, 36; Tabla 6), en un ensayo de ADCC *in vitro* con PBMCs humanas como células efectoras. Al ser las células dianas células SKBR3 que sobre-expresan HER2, las variantes de Fc de IgG usadas en este ensayo fueron generadas sustituyendo los dominios V_H/V_L de E27 anti-IgE por los de anticuerpo anti-HER2; HERCEPTIN® (humAb4D5-8 de la Tabla 1 de Carter et al., *PNAS (USA)* 89: 4285-4289 (1992)). El patrón de ADCC exhibido por las variantes se correlacionó bien con el patrón de unión a FcγRIIIA (Figuras 20 y 21). Cabe destacar que la variante que mostró la mayor mejora en la unión a FcγRIIIA en los ensayos proteína:proteína, la variante 36 S298(317)A, también mostró mejora en ADCC en comparación con HERCEPTIN® de tipo natural a 1,25 ng/mL (Fig. 21).

Ejemplo 5

Unión de variantes de Fc a receptores de Fc polimórficos

En la población humana se han encontrado variantes alélicas de varios de los FcγR humanos. Se ha demostrado que dichas formas alélicas variantes exhiben diferencias en la unión a IgG humana y murina, y una serie de estudios de asociación han correlacionado los resultados clínicos con la presencia de formas alélicas específicas (revisado en Lehrnbecher et al., *Blood* 94(12): 4220-4232 (1999)). Varios estudios han investigado dos formas de FcγRIIA, R131 y H131, y su asociación con los resultados clínicos (Hatta et al. *Genes and Immunity* 1: 53-60 (1999); Yap et al., *Lupus* 8: 305-310 (1999); y Lorenz et al. *European J. Immunogenetics* 22: 397-401 (1995)). Ahora solo se están investigando dos formas alélicas de FcγRIIIA, F158 y V158 (Lehrnbecher et al., ver anterior; y Wu et al., *J. Clin. Invest.* 100(5): 1059-1070 (1997)). En este ejemplo, variantes de IgG seleccionadas fueron evaluadas contra ambas formas alélicas de FcγRIIA o FcγRIIIA. Los ensayos de unión a receptor de Fc se llevaron a cabo esencialmente

como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Sin embargo, para FcγRIIIA-V158 se han llevado a cabo tanto (a) el ensayo de unión a receptor de baja afinidad del Ejemplo 1 (que analiza la unión del complejo de IgG a FcγRIIIA-V158); como (b) el ensayo de unión a FcγR alta afinidad del Ejemplo 4 (que analiza la unión de monómero de IgG a FcγRIIIA-V158). Los resultados de estos estudios se resumen a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10
Unión de variantes a receptores polimórficos FcγRIIA y FcγRIIA

IG2	Res nº EU (Kabat)	Complejo de IgG FcγRIIA-R131			Complejo de IgG FcγRIIA-H131			Complejo de IgG FcγRIIA-F158			Complejo de IgG FcγRIIA-V158			Monómero de IgG FcγRIIA-V158		
		media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n
11	T256(269)A	1,41	(0,27)	9	1,32	(0,18)	9	0,97	(0,03)	2	1,20		1			1
254	T256(269)N	1,03		1	1,13		1	0,95		1	0,88		1			1
14	D265(278)A	0,07	(0,01)	4	0,09	(0,06)	4	0,01		1			1			
15	S267(280)A	1,64	(0,18)	7	1,05	(0,03)	2	1,14	(0,25)	7						
189	S267(280)G	1,21	(0,05)	3	0,59	(0,09)	3	0,09	(0,02)	3						
16	H268(281)A	1,22	(0,14)	12	1,09	(0,01)	2	0,52	(0,09)	12						
25	E283(300)A	1,24	(0,23)	5	1,01	(0,14)	5	1,01	(0,14)	5	0,78		1			1
226	E283(300)Q	1,12		1	1,19		1	1,19		1	0,89		1			1
227	E283(300)S	1,03		1	0,85		1	0,85		1	0,83		1			1
228	E283(300)N	1,18		1	0,94		1	0,94		1	0,63		1			1
229	E283(300)D	1,14		1	0,95		1	0,95		1	0,67		1			1
30	K290(307)A	1,29	(0,21)	7	1,28	(0,21)	7	1,12	(0,05)	2	1,13		1			1
73	K290(307)Q	1,17		1	1,40		1	1,02		1	1,30		1			1
75	K290(307)S	1,27		1	1,26		1	1,05		1	1,62		1			1
77	K290(307)E	1,10		1	1,30		1	0,98		1	1,50		1			1
78	K290(307)R	1,05		1	1,08		1	1,07		1	1,24		1			1
177	K290(307)G	1,07		1	1,23		1	1,11		1	2,29		1			1
31	R292(309)A	0,27	(0,14)	9	0,90	(0,18)	9				0,94		1			1
80	R292(309)K	0,71	(0,17)	3	1,15	(0,18)	3				1,64		1			1
81	R292(309)H	0,21	(0,09)	2	0,92	(0,08)	2				1,21		1			1
82	R292(309)Q	0,47	(0,12)	3	0,45	(0,09)	3				0,56		1			1
83	R292(309)N	0,54	(0,16)	3	0,88	(0,02)	3				0,91		1			1

IG2	Res nº EU (Kabat)	Complejo de IgG FcγRIIA-R131				Complejo de IgG FcγRIIA-H131				Complejo de IgG FcγRIIIA-F158				Complejo de IgG FcγRIIIA-V158			
		media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	
144	E293(310)Q	0,85	(0,03)	2				0,99	(0,04)	2	1,00		1	0,97		1	
33	E294(311)A	0,87	(0,19)	5				0,66	(0,14)	5				0,68		1	
173	E294(311)Q	1,01		1				0,84		1				0,79		1	
174	E294(311)D	0,37		1				0,14		1				0,26		1	
36	S298(317)A	0,40	(0,08)	12				1,30	(0,18)	12	1,02	(0,04)	2	1,96		1	
70	S298(317)G	0,87	(0,17)	4				0,46	(0,09)	4	0,88		1	1,88		1	
71	S298(317)T	0,41	(0,21)	3				0,89	(0,20)	3	0,96		1	0,75		1	
72	S298(317)N	0,08	(0,01)	2				0,06	(0,01)	2	0,66		1	0,17		1	
218	S298(317)V	0,11	(0,06)	3				0,33	(0,19)	3	0,88		1	0,39		1	
219	S298(317)L	1,14	(0,12)	3				0,34	(0,04)	3	0,83		1	0,67		1	
40	V305(324)A	1,12	(0,12)	4	1,04	1		0,84	(0,15)	4							
41	T307(326)A	1,19	(0,37)	12	1,37	(0,13)	2	1,12	(0,18)	12							
45	N315(334)A	1,15	(0,06)	5	1,11	(0,06)	2	1,07	(0,21)	5							
46	K317(336)A	1,13	(0,05)	4	1,04		1	1,10	(0,23)	4							
48	K320(339)A	1,12	(0,11)	4	1,16		1	0,87	(0,17)	4							
54	E333(352)A	0,92	(0,12)	10				1,27	(0,17)	10	1,10	(0,10)	2	1,29		1	
141	E333(352)Q	0,70	(0,05)	2				1,10	(0,03)	2	1,05		1	1,00		1	
142	E333(352)N	0,59	(0,04)	2				0,56	(0,10)	2	0,64		1	0,56		1	
143	E333(352)S							0,94		1	0,99		1	1,07		1	
152	E333(352)K							0,85	(0,14)	3	0,88		1	0,81		1	
153	E333(352)R	0,75	(0,04)	2				0,84	(0,05)	2	0,93		1	0,83		1	
154	E333(352)D							1,26	(0,04)	3	1,00		1	1,70		1	
178	E333(352)G	0,87		1				1,05		1				1,23		1	
55	K334(353)A	1,01	(0,15)	17	1,39	(0,19)	17	1,39	(0,19)	17	1,07	(0,09)	3	1,60	(0,01)	2	
135	K334(353)R	1,15	(0,09)	5				0,68	(0,07)	5				0,88		1	

IG2	Res n° EU (Kabat)	Complejo de IgG FcyRIIA-R131			Complejo de IgG FcyRIIA-H131			Complejo de IgG FcyRIIIA-F158			Complejo de IgG FcyRIIIA-V158		
		media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n	media	sd	n
136	K334(353)Q	1,08	(0,11)	7	1,31	(0,26)	7	1,27	(0,01)	2	1,92		1
137	K334(353)N	1,16	(0,11)	7	1,15	(0,16)	7	1,19	(0,06)	2	1,70		1
138	K334(353)S	1,01	(0,11)	3	1,19	(0,08)	3	1,25		1	1,82		1
139	K334(353)E	0,74	(0,15)	4	1,30	(0,09)	4	1,17		1	2,75		1
140	K334(353)D	0,51	(0,09)	4	1,13	(0,09)	4	1,07		1			1
179	K334(353)G	0,76	(0,08)	5	0,88	(0,22)	5	0,94		1	1,28		1
190	K334(353)M	1,06		1	1,35		1	0,99		1	2,08		1
191	K334(353)Y	1,08		1	1,31		1	0,98		1	1,72		1
192	K334(353)W	0,94		1	1,07		1	0,96		1	1,53		1
193	K334(353)H	1,09		1	1,26		1	0,97		1	2,06		1
220	K334(353)V	1,13	(0,11)	3	1,34	(0,18)	3	1,00		1	2,89		1
221	K334(353)L	1,05		1	1,38		1	0,96		1	3,59		1
65	P331(350)A	1,29	(0,14)	3	1,03	(0,19)	3	0,96		1	0,78		1
198	P331(350)S	1,00		1	0,86		1				0,54		1
199	P331(350)N	0,86		1	0,23		1	0,24			0,24		1
200	P331(350)E	1,06		1	0,42		1	0,36			0,36		1
203	P331(350)K	0,94		1	0,33		1	0,26			0,26		1
96	S267(280)A	1,54	(0,12)	3	1,07	(0,06)	2	0,84		1			
	H268(281)A												
110	S298(317)A	0,35	(0,13)	11	1,66	(0,42)	11	1,19	(0,18)	3			
	E333(352)A												
	K334(353)A												
271	E380(405)A	0,98		1	0,92		1	1,10					1
	L309(328)A												

5 Para FcγRIIIA, el patrón de unión de las variantes de IgG1 seleccionadas a FcγRIIIA-V158 de relativamente mayor afinidad fue el mismo que para FcγRIIIA-F158 de relativamente menor afinidad (la forma F158 se usó para evaluar todas las variantes). Las variantes de IgG1 que mostraron una unión mejorada a la forma FcγRIIIA-F158 también demostraron una unión mejorada a la forma FcγRIIIA-V158 aunque la mejora no fue tan pronunciada. Para FcγRIIA-R131 (usado para evaluar todas las variantes) y FcγRIIA-H131, el patrón de unión de las variantes de IgG1 seleccionadas no mostró ninguna diferencia distintiva. S267(280)A, H268(281)A y S267(280)A/H268(281)A exhibieron una unión mejorada a FcγRIIA-R131, en comparación con la IgG1 nativa, pero no a FcγRIIA-H131. Por el contrario, S267(280)G mostró una unión mejorada a FcγRIIA-R131 pero una unión reducida a FcγRIIA-H131 (Tabla 10). Otras variantes se unieron de forma similar a ambas formas de FcγRIIA alélicas: V305(324)A, T307(326)A, N315(324)A, K317(336)A y K320(339)A.

Listado de secuencias

- <110> Genentech, Inc.
- <120> Variantes de polipéptido con función efectora alterada
- <130> P1726R1PCT
- 15 <141> 2000-01-14
- <150> US 60/116,023
- <151> 15-01-1999
- <160> 11
- <210> 1
- 20 <211> 218
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> Secuencia Artificial
- 25 <222> 1-218
- <223> La secuencia está completamente sintetizada
- <400> 1

ES 2 694 002 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215 218

<210> 2

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Secuencia Artificial

<222> 1-451

10 <223> La secuencia está completamente sintetizada

<400> 2

ES 2 694 002 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105
 Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

ES 2 694 002 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys
 451

<210> 3
 <211> 218
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens

<400> 3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

ES 2 694 002 T3

				65						70					75
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
				80					85					90	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				95					100					105	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				110					115					120	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
				125					130					135	
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
				140					145					150	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
				155					160					165	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
				170					175					180	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
				185					190					195	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
				200					205					210	
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				215			218								

<210> 4
 <211> 218
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens
 <400> 4

ES 2 694 002 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215 218

<210> 5
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 5

5

ES 2 694 002 T3

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 20 25 30
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 35 40 45
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 80 85 90
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 95 100 105
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 110 115 120
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 125 130 135
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 140 145 150
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 155 160 165
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 170 175 180
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 185 190 195
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 200 205 210
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215 217

<210> 6
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 6

5

ES 2 694 002 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45
 Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215 218

<210> 7
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 7

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

ES 2 694 002 T3

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glx Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 215 218

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 8

ES 2 694 002 T3

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

<210> 9
 <211> 218
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 9

ES 2 694 002 T3

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 35 40 45
 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60
 Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 125 130 135
 Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 140 145 150
 Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165
 Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 200 205 210
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 215 218

<210> 10
 <211> 218
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10

ES 2 694 002 T3

Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 35 40 45
 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60
 Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 65 70 75
 His Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val
 140 145 150
 Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
 155 160 165
 Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
 185 190 195
 Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
 200 205 210
 Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215 218

<210> 11
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11

5

ES 2 694 002 T3

Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His
 35 40 45
 Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr
 50 55 60
 Gln Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165
 Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr
 185 190 195
 Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys
 200 205 210
 Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215 218

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc de IgG1 humana, variante que se une a un receptor gamma de Fc III (FcγRIII) con mejor afinidad que el polipéptido original, y donde la variante comprende una región Fc de IgG1 humana variante con al menos una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 2.** La variante de la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo.
- 10 **3.** La variante de la reivindicación 1, que media en ADCC entre 1,5 veces y 100 veces más efectivamente que el polipéptido original.
- 4.** La variante de la reivindicación 1, que además se une a un FcγRII con una peor afinidad que el polipéptido original.
- 5.** La variante de la reivindicación 1, que comprende al menos una modificación de aminoácido en un dominio CH2 de la región Fc.
- 15 **6.** La variante de la reivindicación 1, que comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc, diferente a la región de bisagra inferior de la misma.
- 7.** La variante de la reivindicación 1, que comprende dos o más sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido enumeradas en ella.
- 20 **8.** La variante de la reivindicación 1, que comprende tres o más sustituciones de aminoácido en las posiciones de aminoácido enumeradas en ella.
- 25 **9.** Un anticuerpo o polipéptido de inmunoadhesina que comprende una región Fc de IgG1 humana variante con una afinidad de unión a receptor gamma de Fc (FcγR) alterada, polipéptido que comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 324, 326, 327, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, y donde la modificación de aminoácido en la posición de aminoácido 340, si se produce, es K340M, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 30 **10.** El polipéptido de la reivindicación 9, que presenta una unión reducida a un FcγR y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, y donde la modificación de aminoácido en la posición de aminoácido 340, si se produce, es K340M, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 35 **11.** El polipéptido de la reivindicación 9, que presenta una unión reducida a un FcγRI.
- 12.** El polipéptido de la reivindicación 11, que presenta una unión reducida a un FcγRI y comprende una modificación de aminoácido en uno cualquiera o más de los aminoácidos 265, 269, 270 o 327 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 40 **13.** El polipéptido de la reivindicación 9, que presenta una unión reducida a un FcγRII.
- 14.** El polipéptido de la reivindicación 13, que presenta una unión reducida al FcγRII y que comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 45 **15.** El polipéptido de la reivindicación 9, que presenta una unión reducida a un FcγRIII.
- 50 **16.** El polipéptido de la reivindicación 15, que presenta una unión reducida al FcγRIII y que comprende una modificación de aminoácido en uno cualquiera o más de los aminoácidos 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 327, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., *Sequences*

of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

17. El polipéptido de la reivindicación 16, que comprende una de las sustituciones de aminoácido D265A, D265N o D265E.
- 5 18. El polipéptido de la reivindicación 9, que presenta una unión incrementada a un FcγR y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 10 19. El polipéptido de la reivindicación 18, que presenta una unión incrementada a un FcγRIII.
20. El polipéptido de la reivindicación 19, que comprende las sustituciones de aminoácido S298A/E333A/K334A en combinación.
21. El polipéptido de la reivindicación 18, que además presenta una unión reducida a un FcγRII.
- 15 22. El polipéptido de la reivindicación 21, que presenta una unión incrementada al FcγRIII y además presenta una unión reducida al FcγRII, donde el polipéptido comprende una modificación de aminoácido en las posiciones 298 y/o 333 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 20 23. El polipéptido de la reivindicación 18, que presenta una unión incrementada a un FcγRII.
24. El polipéptido de la reivindicación 23, que presenta una unión incrementada al FcγRII y comprende una modificación de aminoácido en uno cualquiera o más de los aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 326, 330, 337, 340, 378, 398 o 430 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 25 25. El polipéptido de la reivindicación 23, que además presenta una unión reducida a un FcγRIII.
26. El polipéptido de la reivindicación 25, que presenta una unión incrementada al FcγRII y además presenta una unión reducida al FcγRIII, donde el polipéptido comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 268, 272, 298, 301 o 340 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 30 27. Un anticuerpo o polipéptido de inmunoadhesina que comprende una región Fc de IgG1 humana variante con afinidad de unión a receptor de Fc neonatal (FcRn) alterada, polipéptido que comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 253, 255, 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 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 35 28. El polipéptido de la reivindicación 27, que presenta una unión reducida a un FcRn.
- 40 29. El polipéptido de la reivindicación 28, que presenta una unión reducida al FcRn y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 45 30. El polipéptido de la reivindicación 27, que presenta una unión incrementada a FcRn.
31. El polipéptido de la reivindicación 30, que presenta una unión incrementada a FcRn y comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de la región Fc, donde la numeración de los residuos de la región Fc corresponde al índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).
- 50 32. El polipéptido de la reivindicación 31, que comprende al menos una de las sustituciones de aminoácido N434A, T307Q, T307A y E380A.

33. Una composición que comprende el polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
34. Un polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 para uso como medicamento.
35. Ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32.
- 5 36. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 35.
37. Una célula hospedante que contiene el vector de la reivindicación 36.
38. Un método para producir un polipéptido variante que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 37 de tal modo que el ácido nucleico es expresado, y recuperar el polipéptido variante del cultivo de la célula hospedante.
- 10 39. Un método *in vitro* para fabricar una región Fc variante con afinidad de unión mejorada a receptor gamma de Fc III (FcγRIII), o una actividad mejorada de citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), que comprende: (a) introducir una o más modificaciones de aminoácido como las definidas en la reivindicación 1 en una región Fc de un polipéptido original para generar una región Fc variante; (b) identificar una región Fc variante con afinidad de unión mejorada a FcγRIII, o con actividad de ADCC mejorada.
- 15 40. El método de la reivindicación 39, donde la etapa (b) comprende determinar la unión de la región Fc variante a un FcR *in vitro*.
41. El método de la reivindicación 39, donde la etapa (b) comprende determinar la unión de la región Fc variante a al menos dos FcRs diferentes.
- 20 42. El método de la reivindicación 41, donde los receptores de Fc incluyen el receptor gamma de Fc II humano (FcγRII) y el receptor gamma de Fc III humano (FcγRIII).

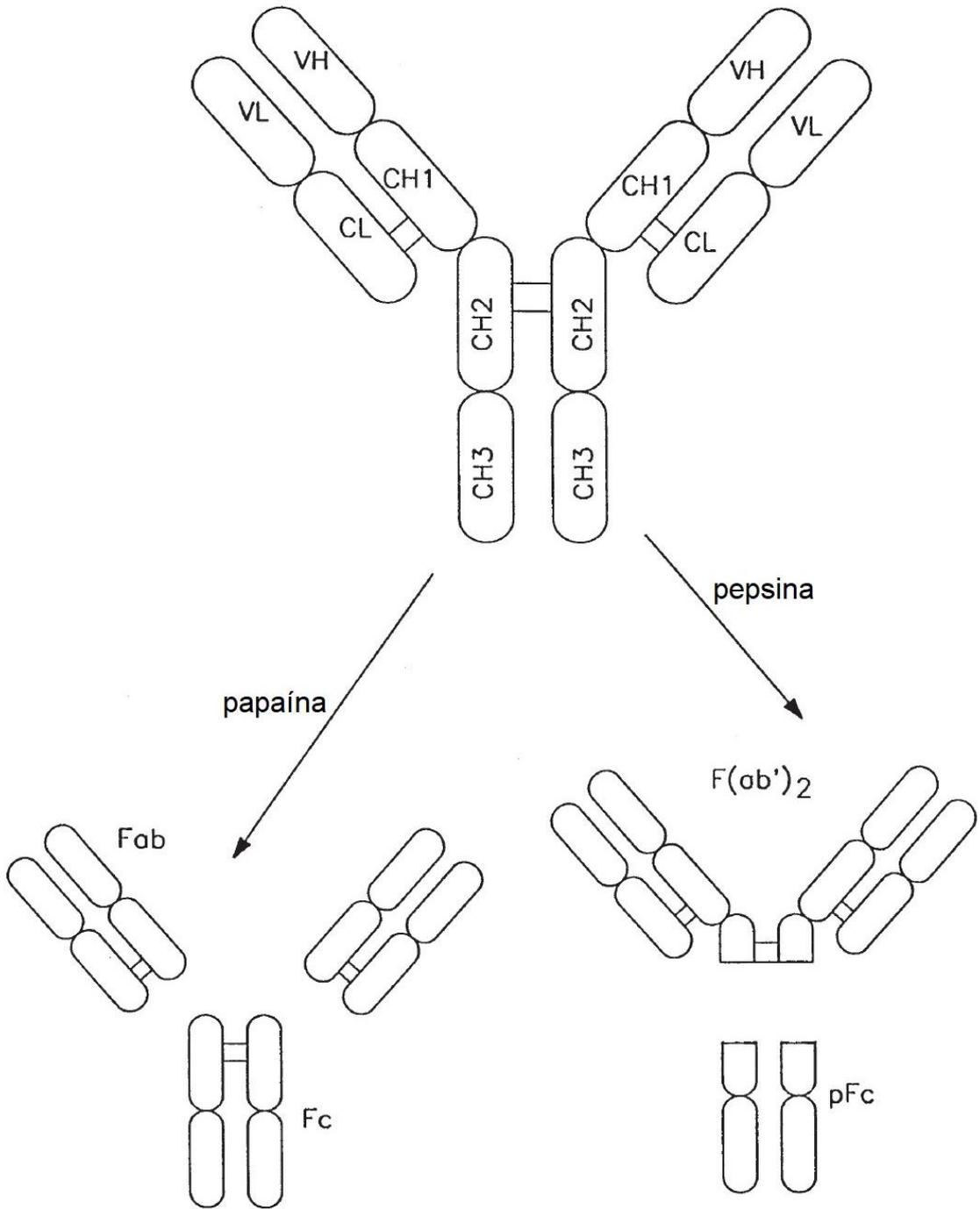


FIG. 1

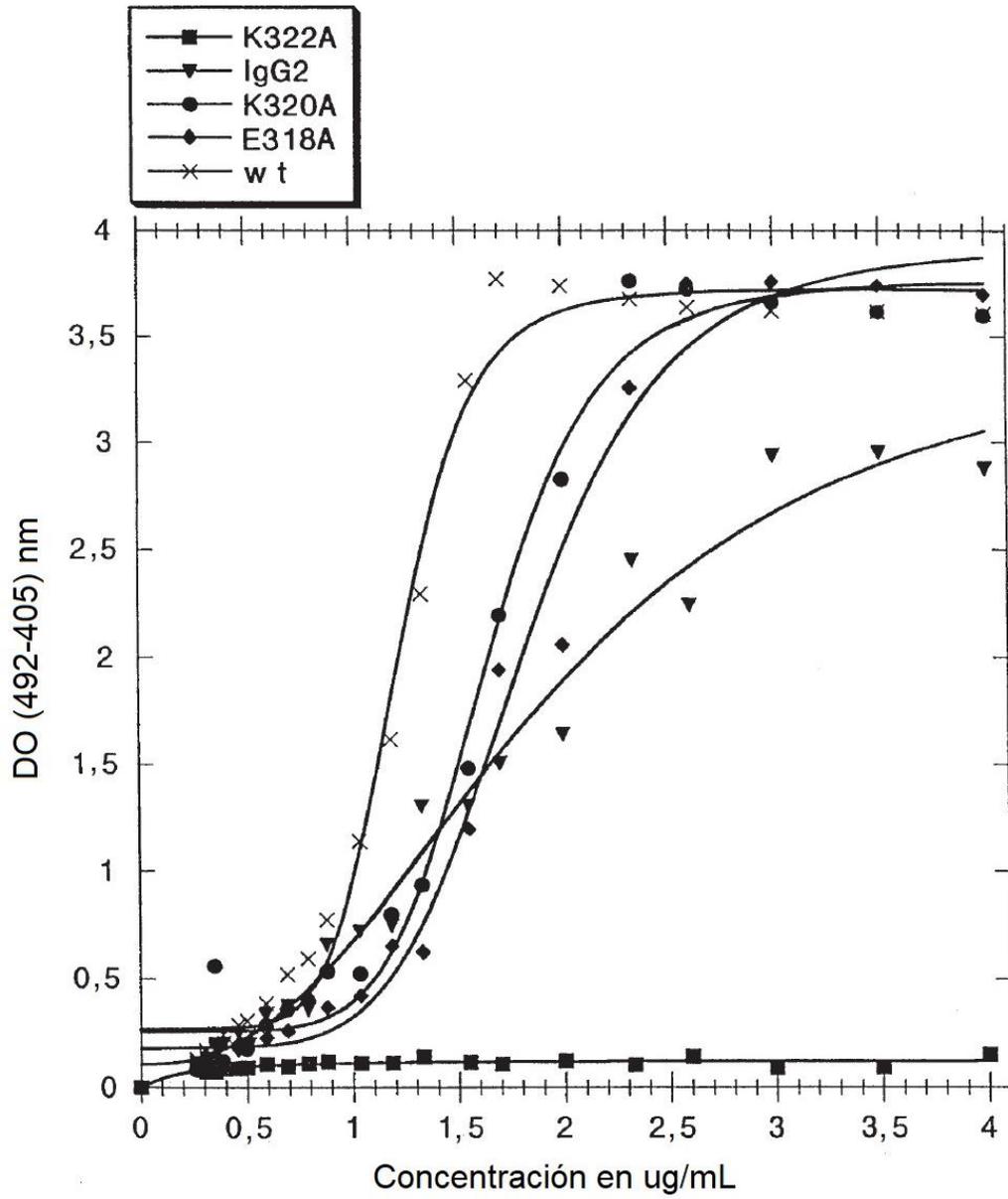


FIG. 2

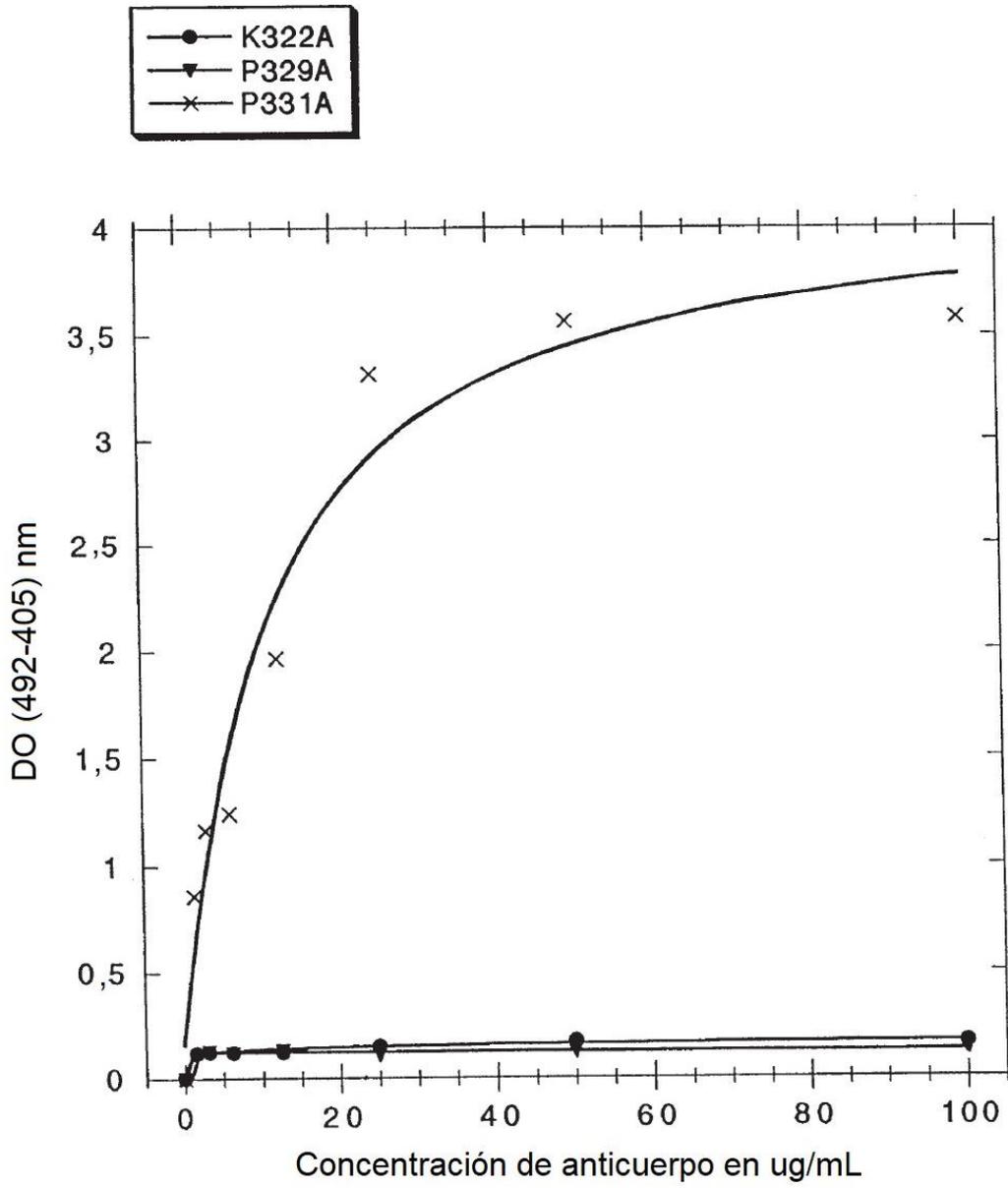


FIG. 3

FIG. 4A (E27) - Cadena ligera

DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSRFSGSG
 SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRITVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
 NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
 KSFNRGEC

FIG. 4B (E27) - Cadena pesada

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITI
 SRDSDKNTFY LQMNSLRAED TAVYICARGS HYFGHWHFV WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
 GGTAALGCLV KDYFPEPTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
 SNTKVDKKEVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDSGSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNY TQKSLSLSPG K

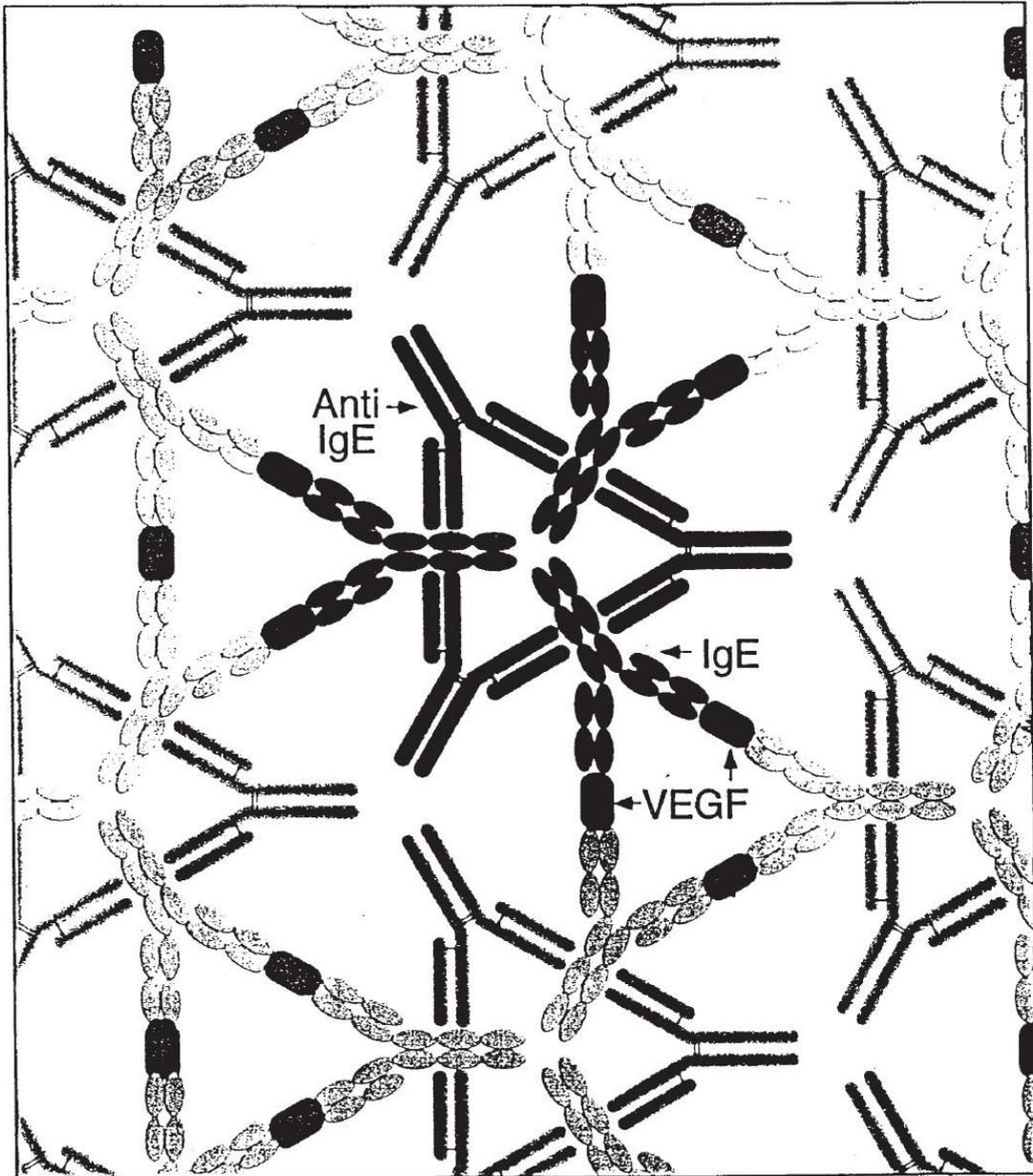


Fig. 5

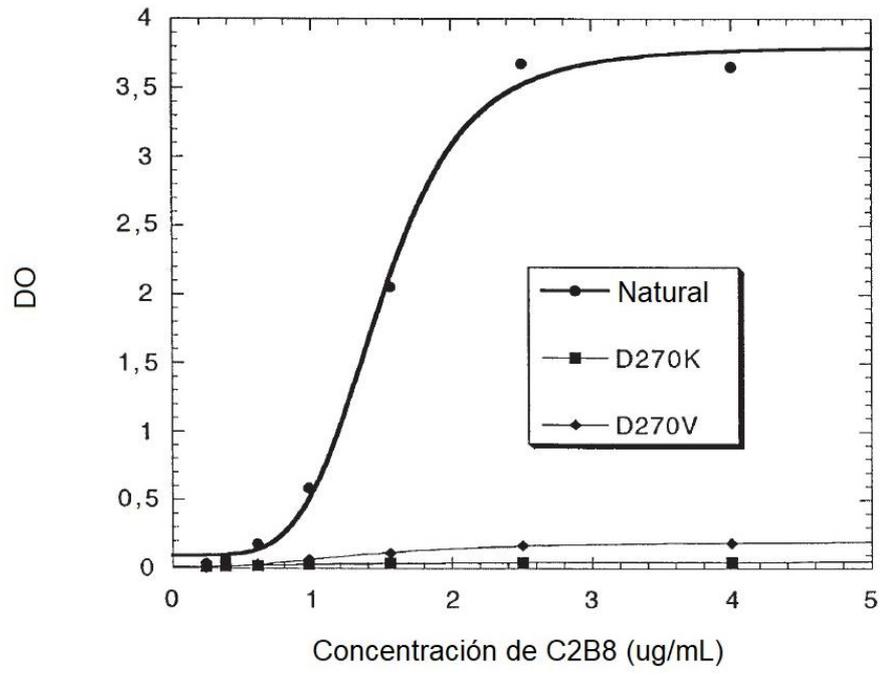


FIG. 6

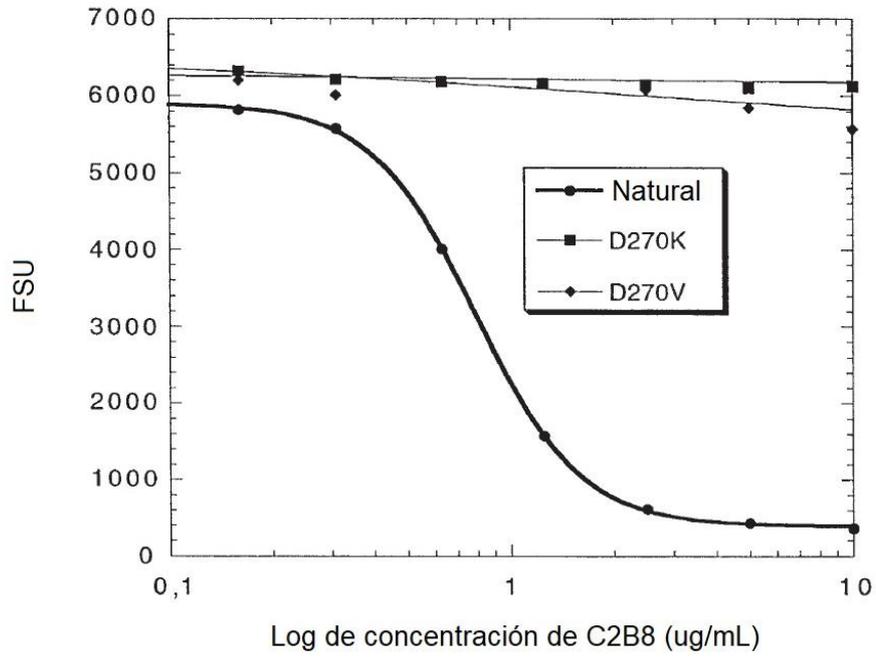


FIG. 7

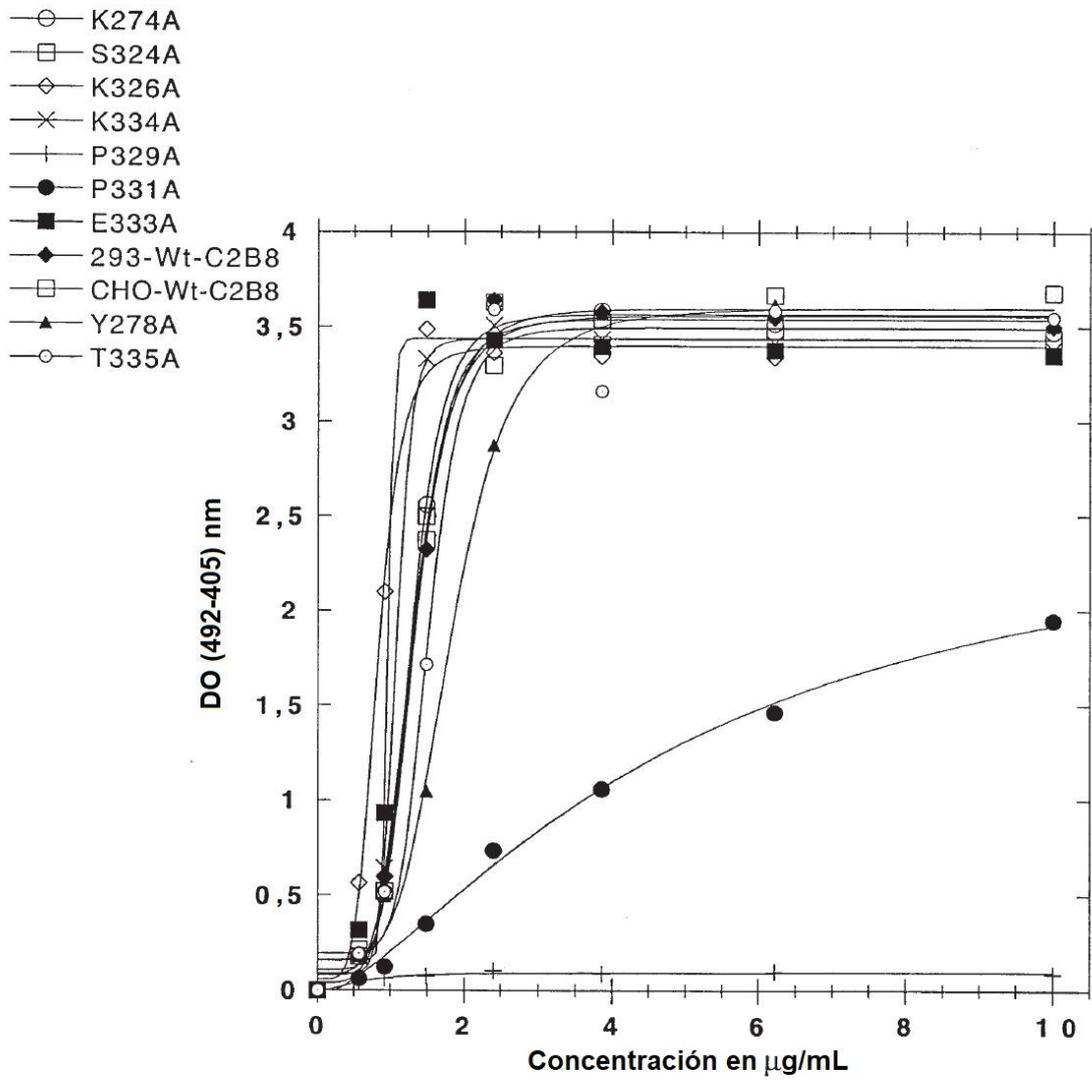


FIG. 8

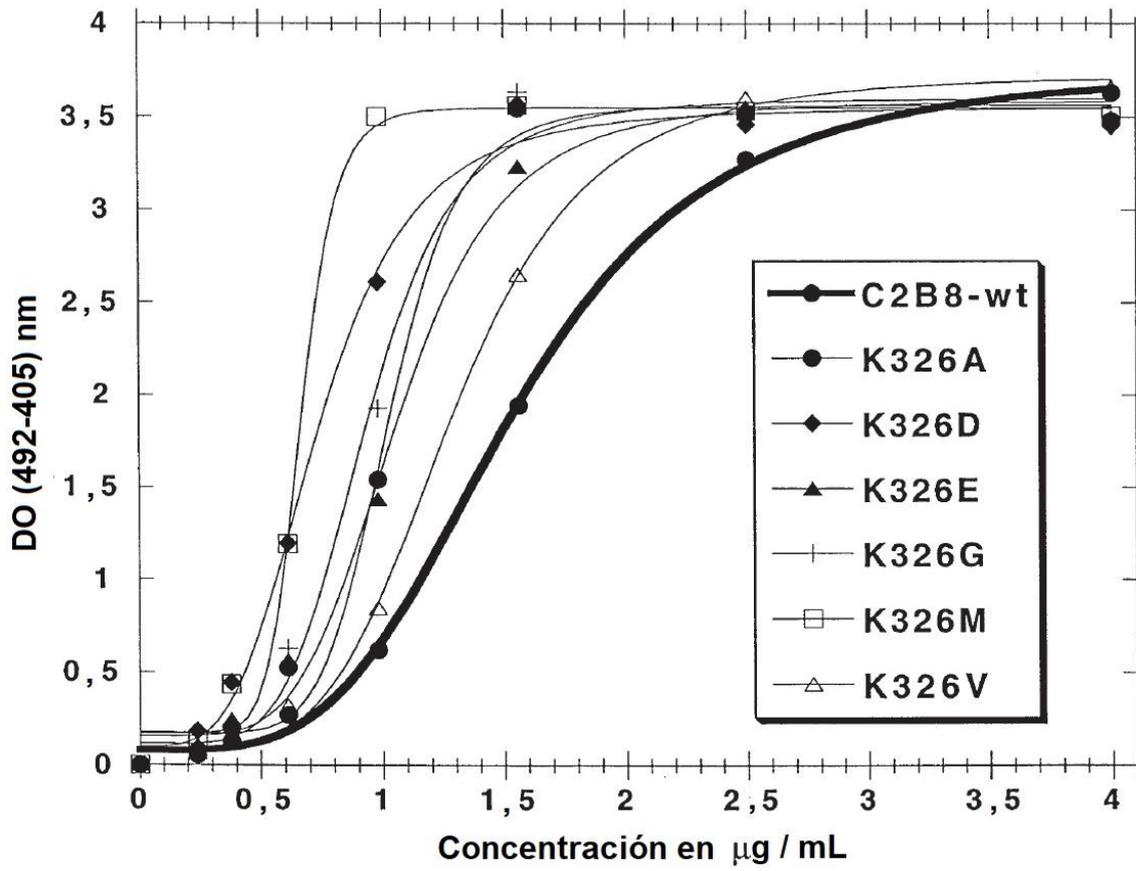


FIG. 9

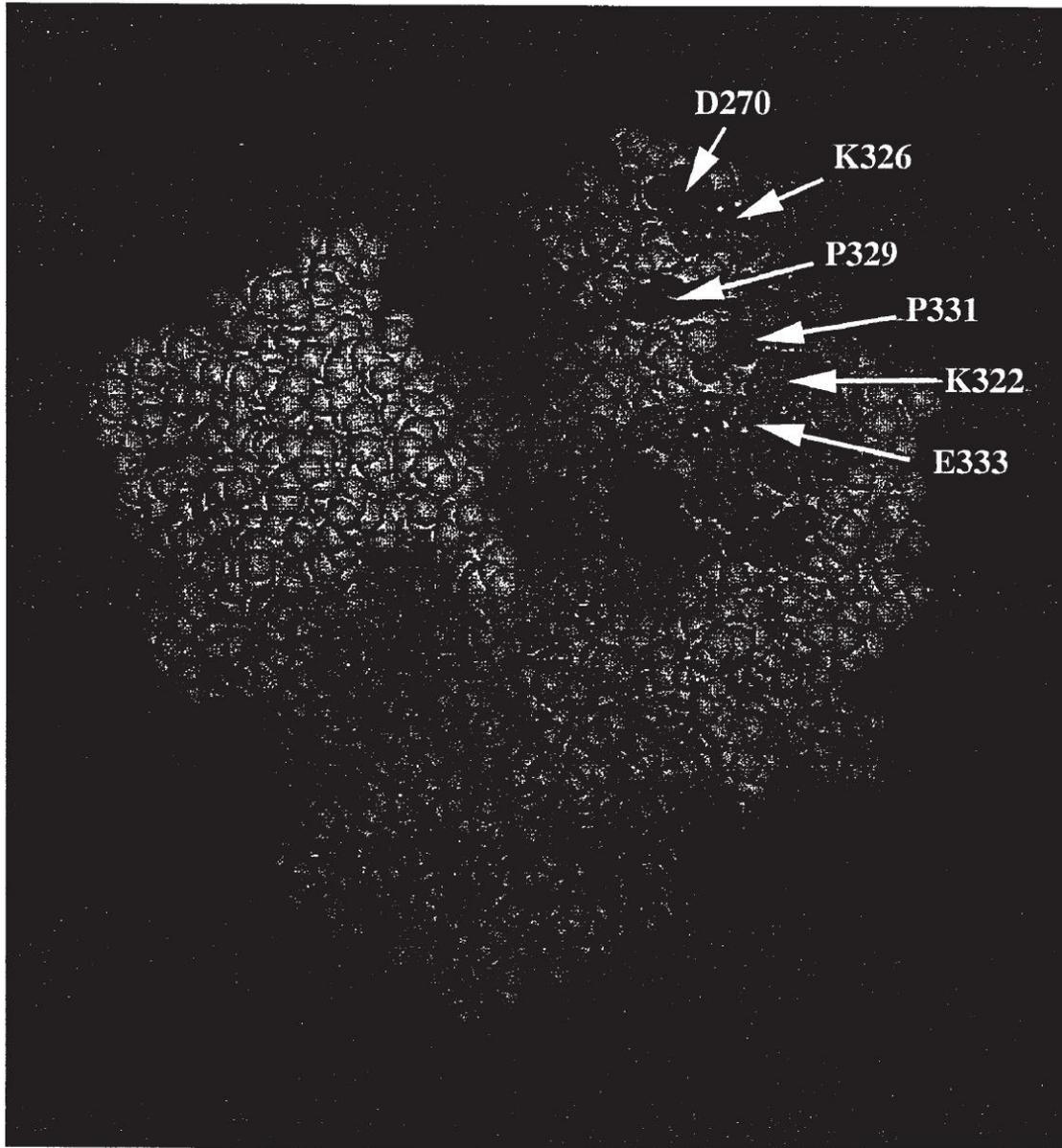


FIG. 10

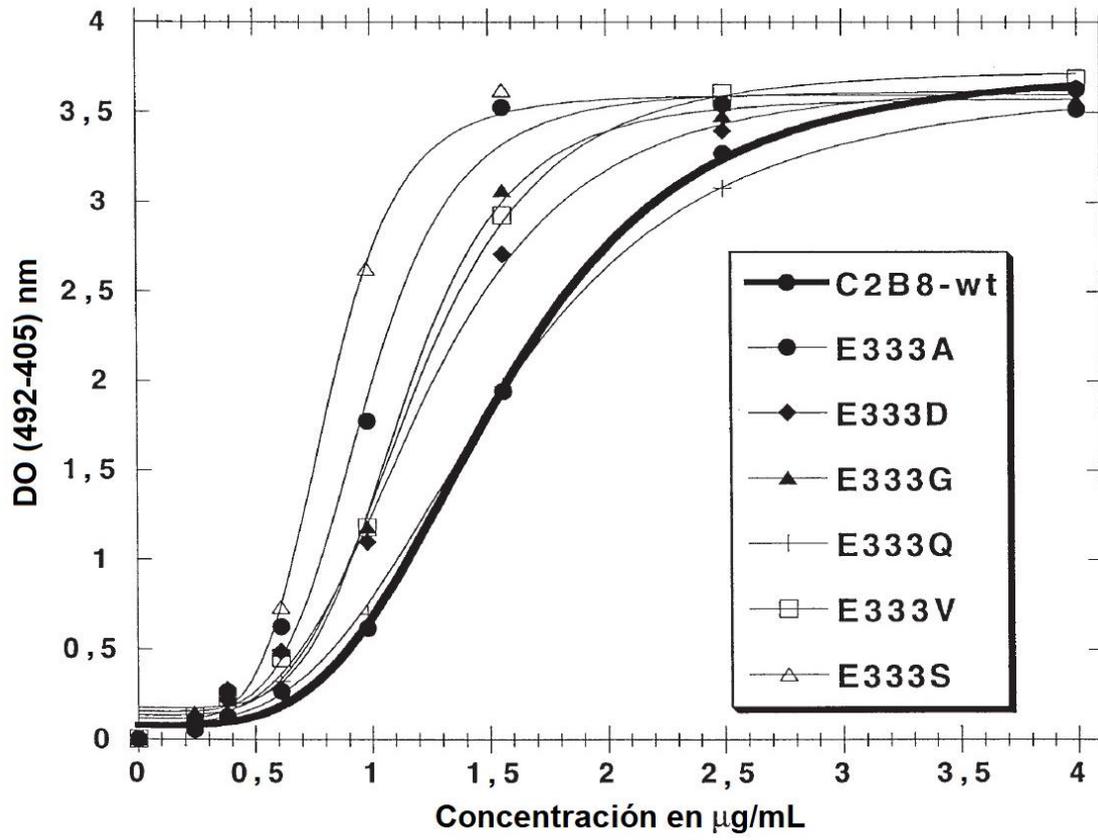


FIG. 11

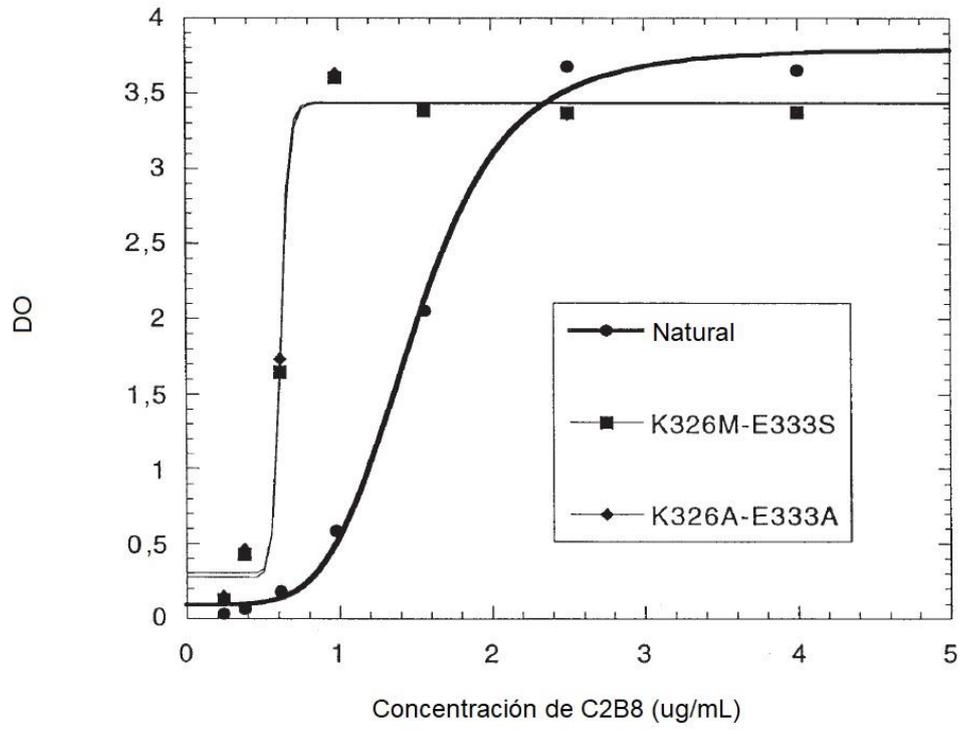


FIG. 12

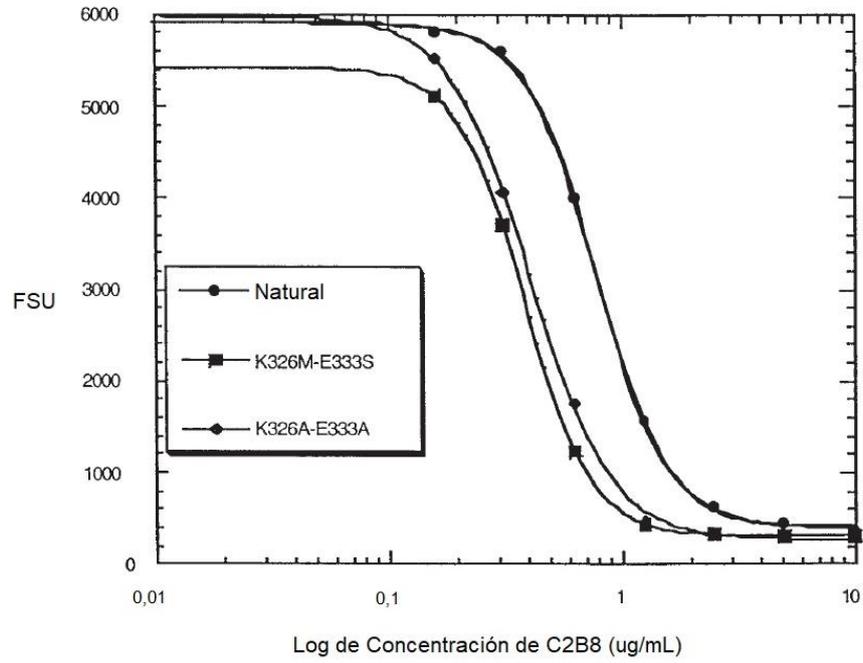


FIG. 13

EC50 de wt-C2B8 = 1,54
 EC50 de A327g (C2B8) = 1,08

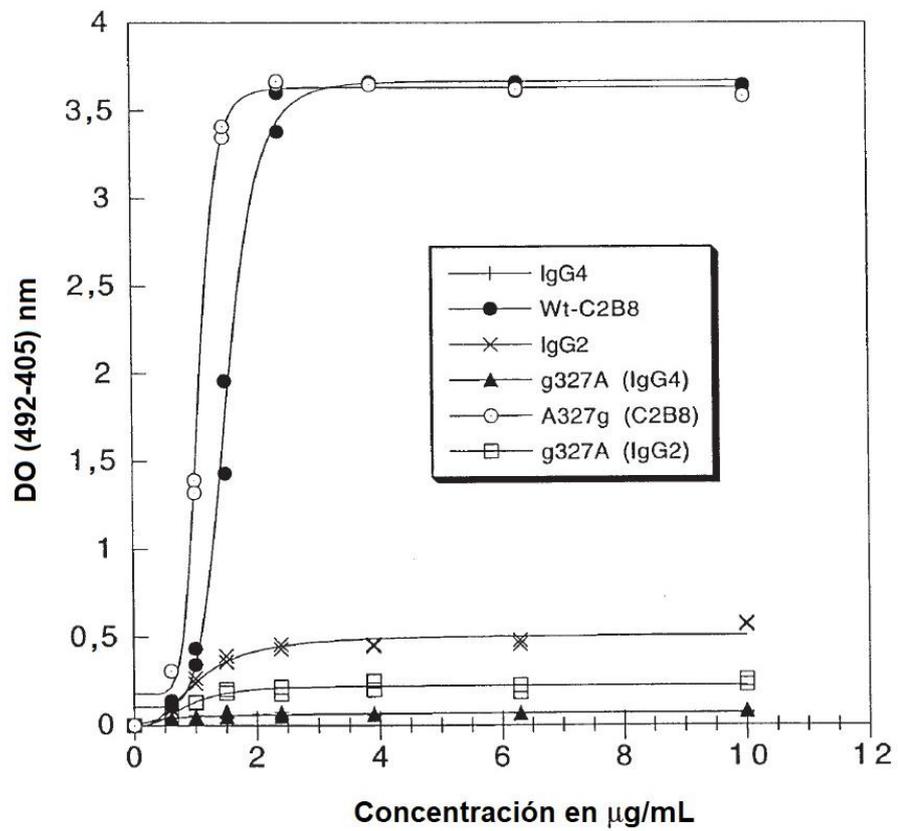


FIG. 14

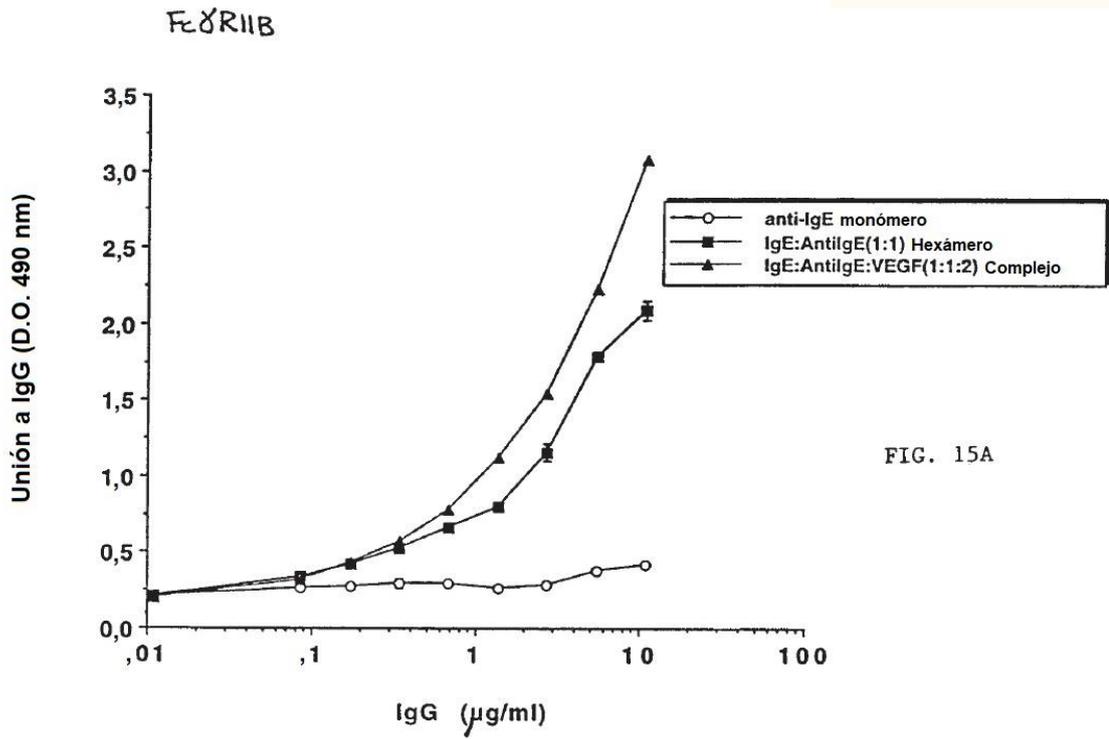


FIG. 15A

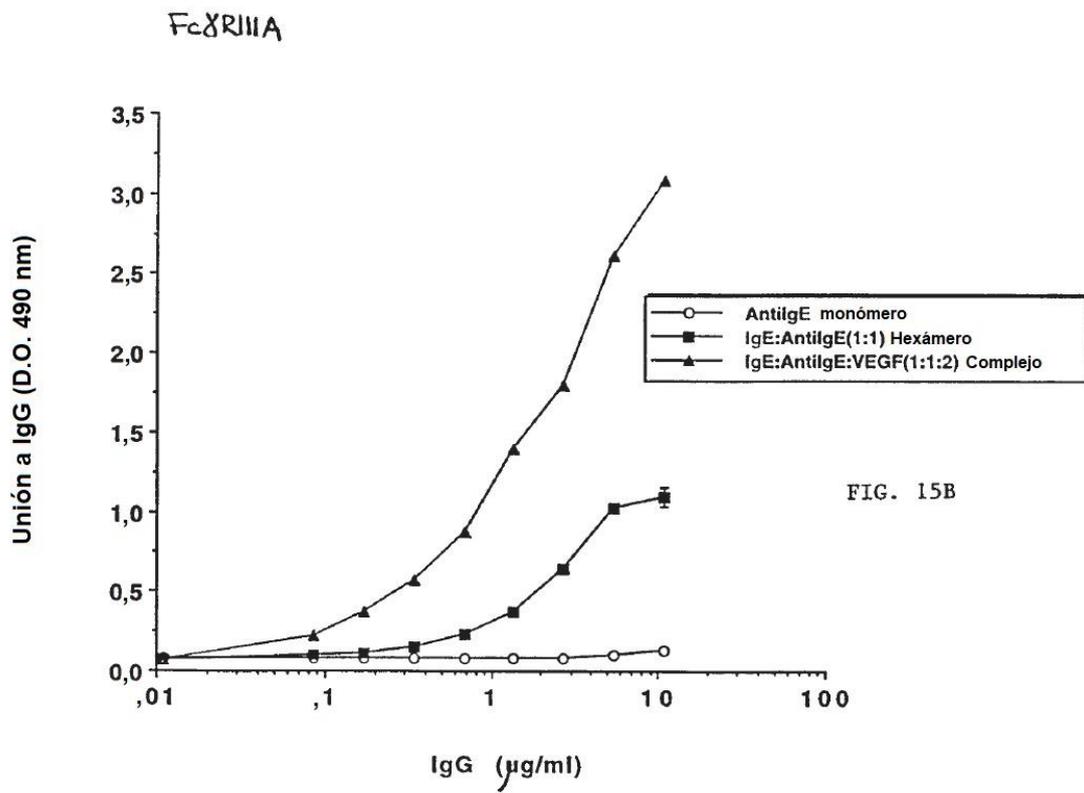
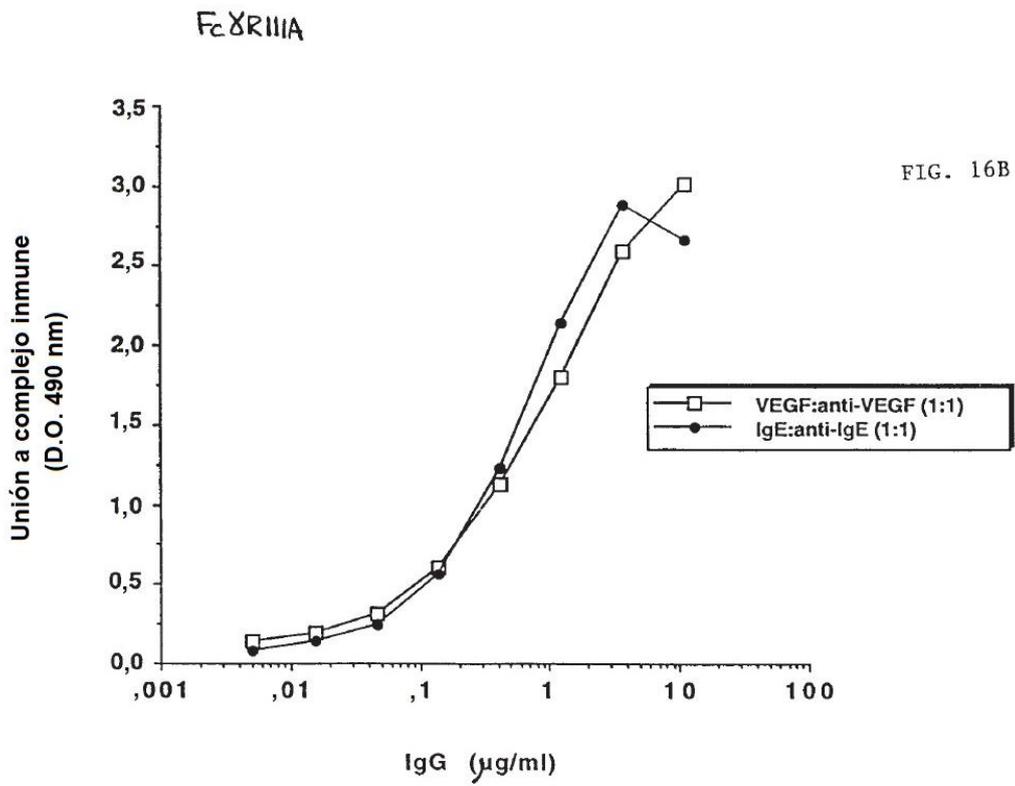
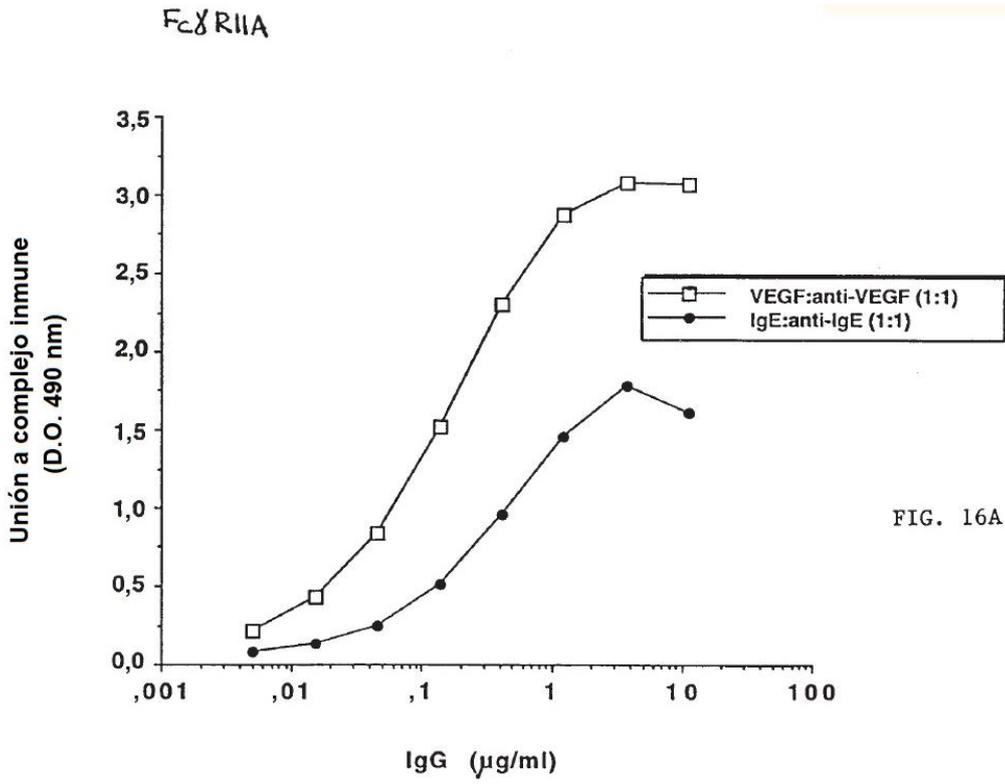


FIG. 15B



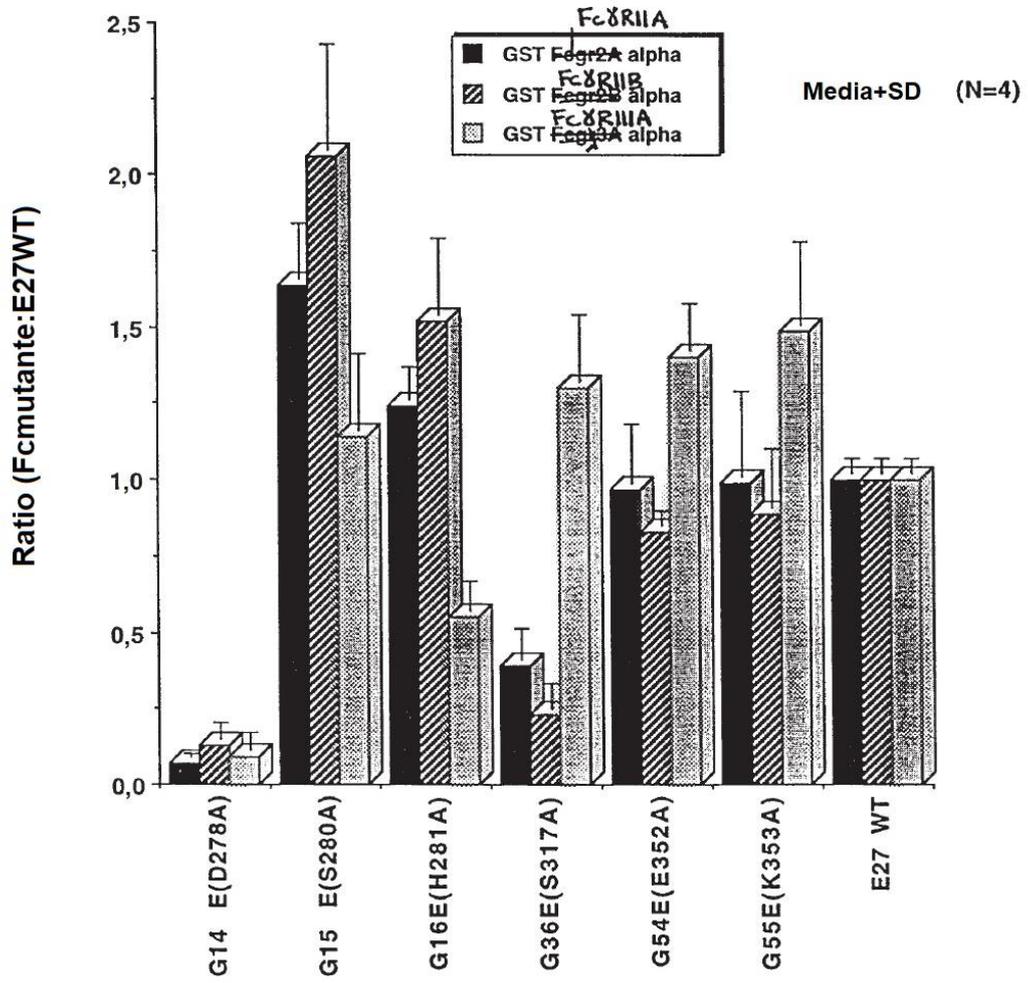


FIG. 17

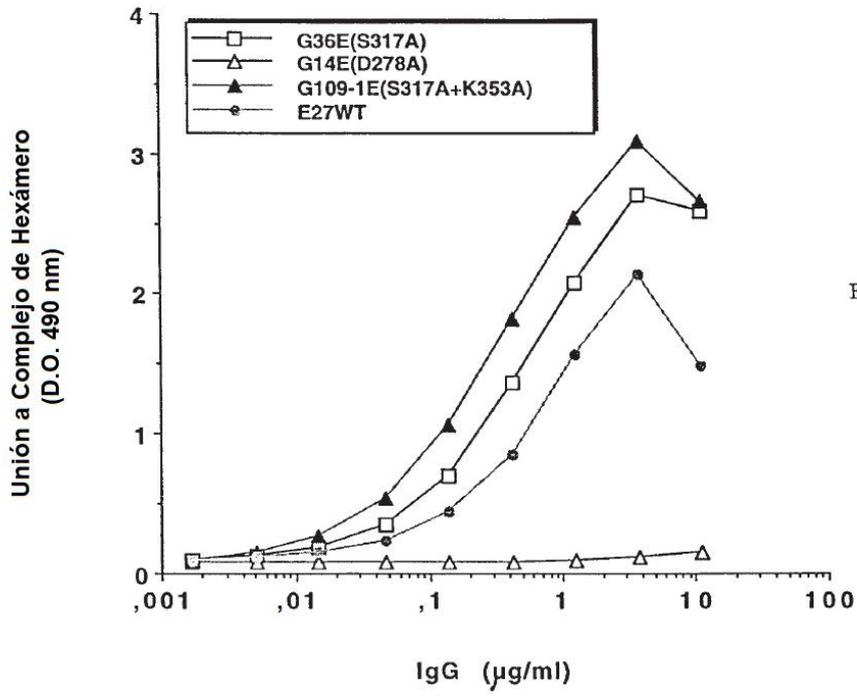


FIG. 18A

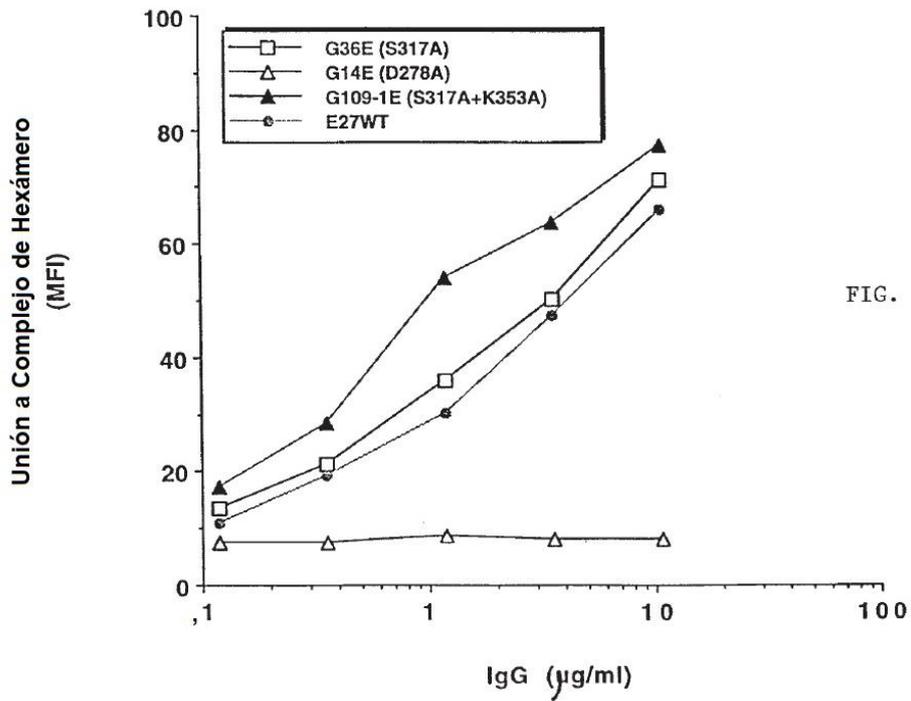


FIG. 18B

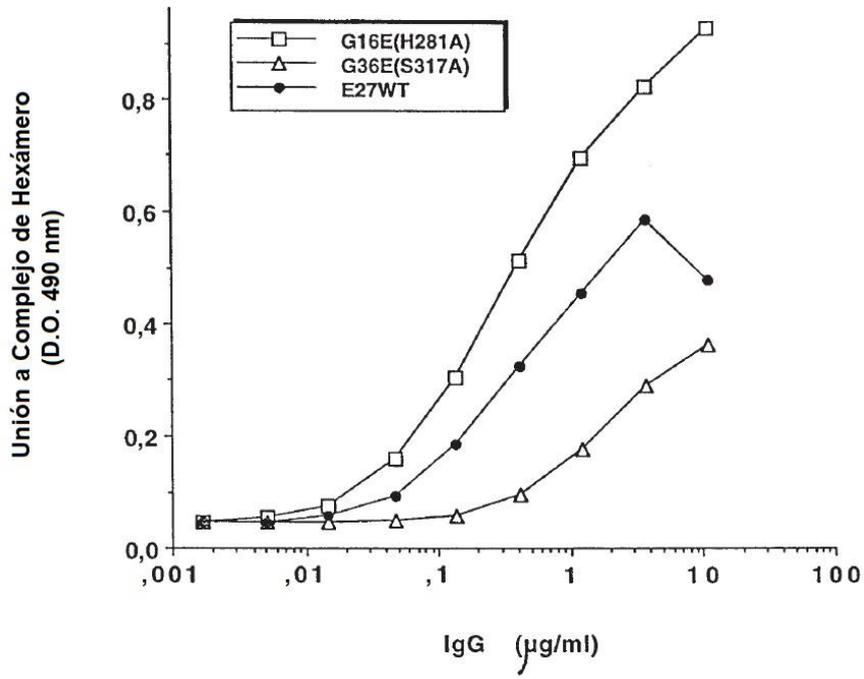


FIG. 19A

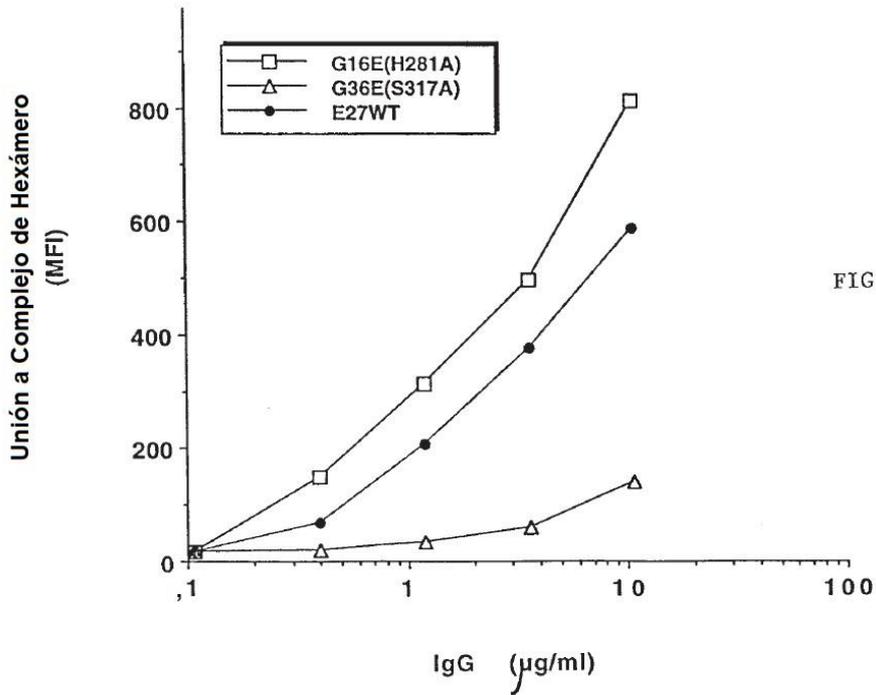


FIG. 19B

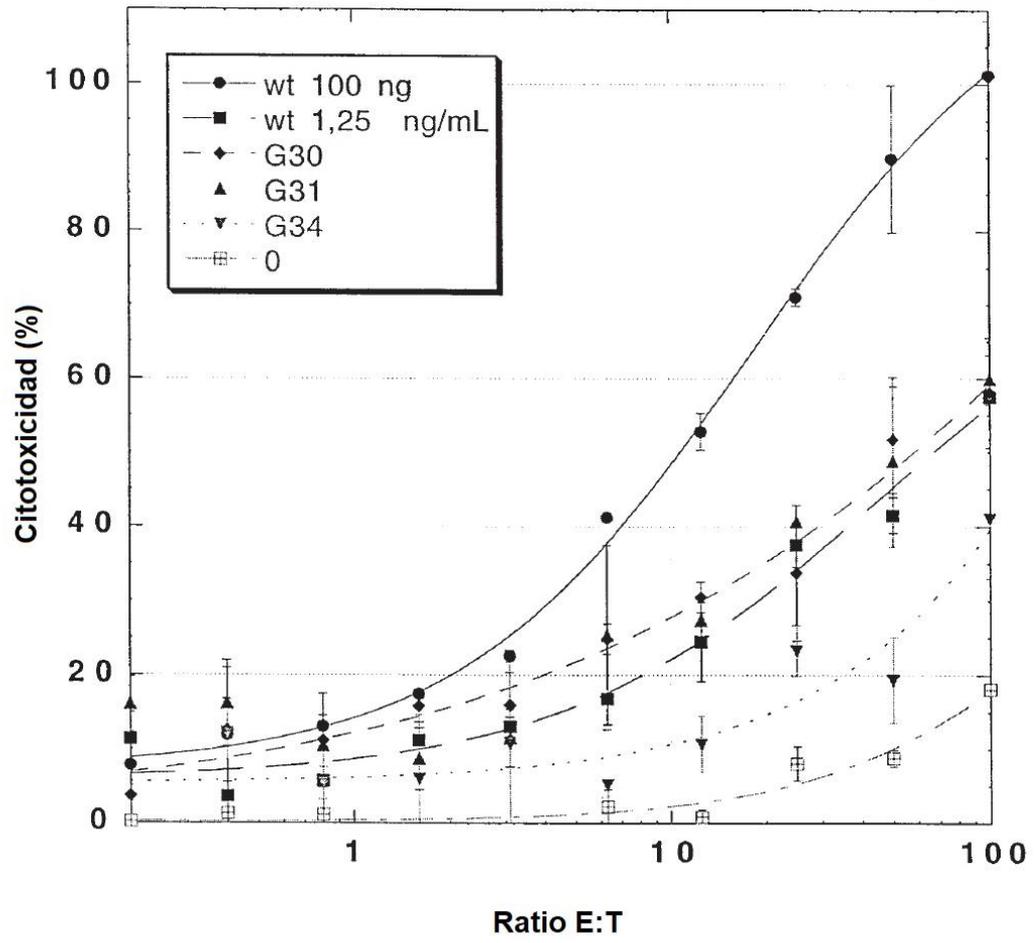


FIG. 20

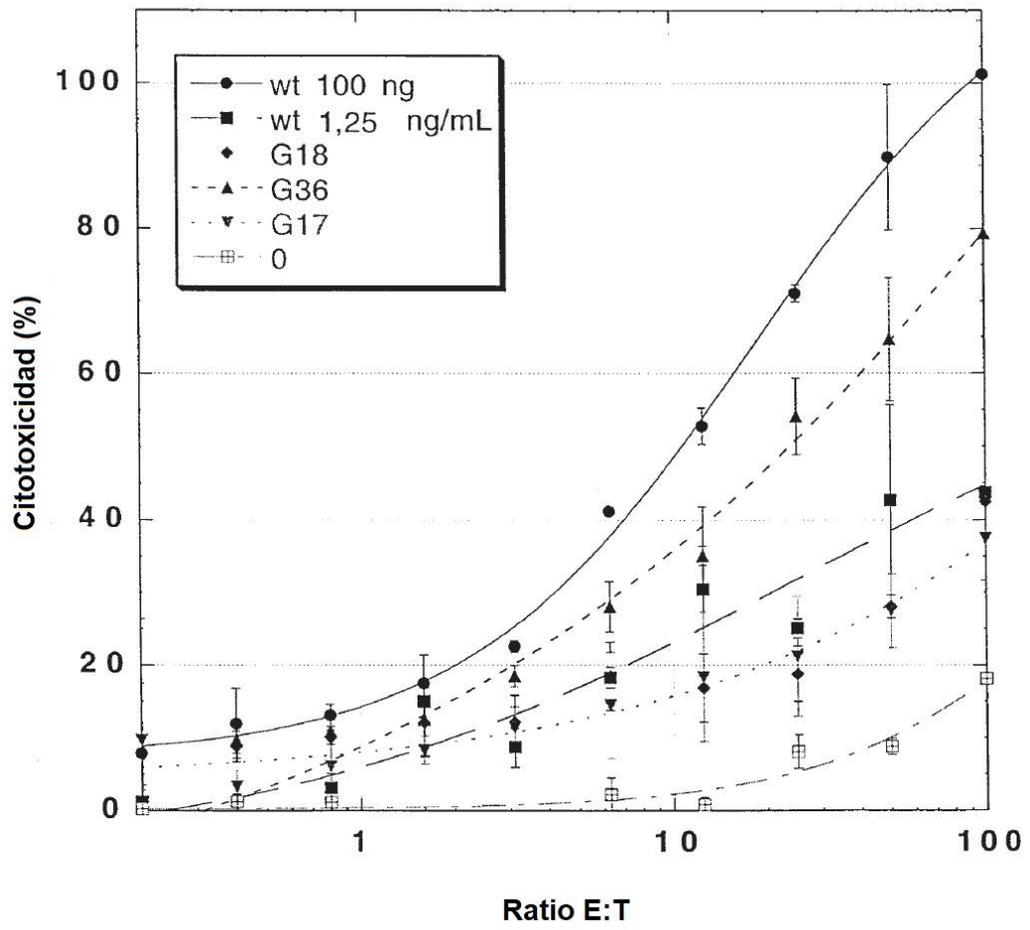


FIG. 21

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP - PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYV				
murIgG1	---TVPEVSSVFIFFPPKPKDVLTTITLTPKVTTCVVVDISKDDPEVQFSWFV				
murIgG2A	PAPNLLGGPSVFIFFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG2B	PAPNLEGGPSVFIFFPPNIKDVLMLISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG3	PPGNILGGPSVFIFFPPKPKDALMISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVHVSWFV				
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
murIgG1	DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFV				
murIgG2A	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLV				
murIgG2B	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLV				
murIgG3	DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRSGKEFKCKVNNKALP				
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV D L				
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
murIgG1	APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV				
murIgG2A	APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV				
murIgG2B	SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV				
murIgG3	APIERTISKPKGRAQTPQVYTIPPPQEQMSKKVSLTCLVTNFFSEAISV				
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCFSVMH				
humIgG4	EWZSNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMH				
murIgG1	EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLH				
murIgG2A	EWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH				
murIgG2B	EWTNSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDVSFSCNVRH				
murIgG3	EWERNGELEQDYKNTPPILSDSGTYFLYSKLTVDTDSWLQGEIFTCSVVH				
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGLK				
murIgG1	EGLHNHHTTEKSLSHSPGK				
murIgG2A	EGLHNHHTTKSFSRTPGK				
murIgG2B	EGLKNYYLKKTISRSPGK				
murIgG3	EALHNHHTQKNLSRSPGK				

FIG. 22A

Porcentaje de identidad entre secuencias Fc

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. humIgG1	-	94	94	94	64	66	63	68
2. humIgG2		-	93	92	65	63	60	67
3. humIgG3			-	91	64	64	61	67
4. humIgG4				-	62	64	61	64
5. murIgG1					-	65	61	67
6. murIgG2A						-	77	70
7. murIgG2B							-	68
8. murIgG3								-

FIG. 22B

ES 2 694 002 T3

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV				
		****			* * *
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
			* *	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
		**	*	*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH				
		*	*	*	* * *
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
		**	*		

FIG. 23

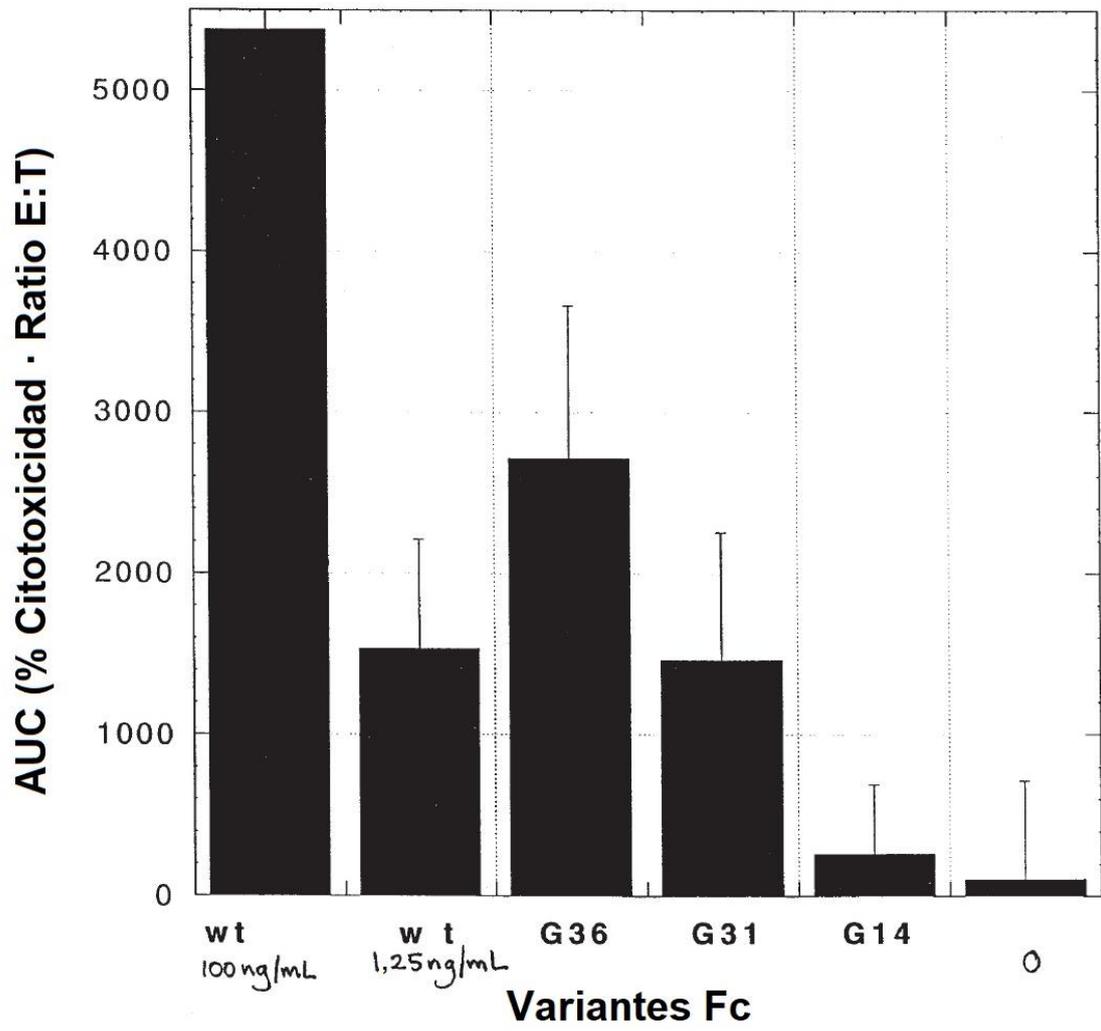


FIG. 24