

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 599**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14720003 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2970436**

54 Título: **Variantes de Fc**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791624 P

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

11.02.2019

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**HARDING, FIONA A.;
HINTON, PAUL R.;
XIONG, MENGLI;
RAZO, OLIVIA JENNIFER y
YE, SHIMING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 599 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de Fc

5 3. Antecedentes

La región del fragmento cristalizante ("Fc") de un anticuerpo está compuesta por dos fragmentos proteínicos idénticos, derivados del segundo y tercer dominios constantes de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Las regiones Fc se unen a los receptores de los inmunocitos conocidos como receptores Fc ("FcRs"), lo que conduce a señales activadoras e inhibitoras. Por ejemplo, el FcγRIIIA (también conocido como CD16 o CD16a) se encuentra en linfocitos citolíticos naturales (NK) y macrófagos, y tiene una baja afinidad por las regiones Fc. La unión del ligando Fc a un receptor FcγRIIIA puede resultar en la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la inducción de la liberación de citocinas por macrófagos. En contraste, el receptor FcγRIIB (también conocido como CD32b) se encuentra en los macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y eosinófilos, y la unión del ligando Fc a un receptor FcγRIIB inhibe la actividad celular.

Las diferencias en la señalización afectada por diferentes FcR se basan en diferencias estructurales. Dentro de la familia del receptor Fc gamma ("FcγR"), que incluye FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIIA (CD16a) y FcγRIIIB (CD16b), los receptores Fc generan señales de activación a través de un motivo conocido como Motivo de Activación del Inmunorreceptor basado en Tirosina (ITAM). FcγRIIA, FcγRI y FcγRIIIA, todos producen señales de activación a través de sus ITAM, o mediante interacción con una subunidad que contiene ITAM. Alternativamente, un receptor Fc puede contener un Motivo Inhibidor del Inmunorreceptor basado en Tirosina (ITIM) que genera señales inhibitoras. FcγRIIB1 y FcγRIIB2, formas alternativamente empalmadas de FcγRIIB (denominados colectivamente "FcγRIIB") tienen secuencias ITIM, y por lo tanto actúan como receptores Fc inhibidores (véase Blank et al., 2009, Immunol Rev. 232(1):59-71).

Al alterar las regiones Fc de los anticuerpos, se pueden realizar mejoras para aumentar la eficacia terapéutica de éstos, aumentar su vida media y reducir los efectos secundarios no deseados.

30 4. Resumen

Debido a que FcγRIIIA genera señales que activan los inmunocitos, en particular las células que median la ADCC, se cree que la disminución de la unión de Fc a FcγRIIIA dará como resultado una disminución de la activación de los inmunocitos y menores niveles de ADCC. Además, debido a que FcγRIIB genera señales que inhiben los inmunocitos, el doble efecto del aumento de la unión de Fc a FcγRIIB junto con la disminución de la unión de Fc a FcγRIIIA dará como resultado una mayor inhibición de la activación de los inmunocitos en comparación con la modulación de la unión de un solo receptor. Los inventores de la presente identificaron sustituciones de aminoácidos individuales o mutaciones puntuales en los dominios CH2 de las moléculas Fc que afectan la unión a ambos receptores Fc. Por ejemplo, como se analizará en detalle más adelante, las sustituciones de aminoácidos en una sola posición (*p. ej.*, V263) pueden aumentar significativamente la unión a FcγRIIB y disminuir la unión a FcγRIIIA. La incorporación de dichas sustituciones de aminoácidos en anticuerpos y otras moléculas terapéuticas basadas en Fc puede resultar en variantes de los polipéptidos con una mayor inhibición de la activación de los inmunocitos en comparación con las sustituciones que modulan la unión a un único receptor. Las variantes de los polipéptidos son particularmente adecuadas para el tratamiento de indicaciones para las cuales la inducción de la activación inmunitaria no es deseable, por ejemplo en el tratamiento de trastornos inmunitarios.

En una realización de la presente invención, se proporciona un anticuerpo que comprende un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, que tiene en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2 (a) una sustitución o conjunto de sustituciones según el índice EU de Kabat elegido entre: (i) V273E, (ii) V273F, (iii) V273M, (iv) V273S, (v) V273Y (vi) V263L y V273E, (vii) V263L y V273F, (viii) V263L y V273M, (ix) V263L y V273S y (x) V263L y V273Y; (b) la sustitución V263L según el índice EU de Kabat donde el anticuerpo se une específicamente a una molécula coestimuladora elegida entre CD40; o (c) la sustitución V263L según el índice EU de Kabat donde el anticuerpo se une específicamente a una molécula coestimuladora elegida entre CD28, PD-1, CTLA-4, CD80, CD86, TIM3, OX40, 4-1BB, GITR, CD27, B7-H4 y DC-SIGN; opcionalmente, donde el dominio CH2 es parte de un dominio Fc que contiene T250Q y M428L según el índice EU de Kabat.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un compuesto conjugado que comprende el anticuerpo de la invención unido a una molécula efectora o a un marcador detectable.

En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, o el compuesto conjugado de la invención.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención.

En otra realización de la presente invención, se proporciona una célula huésped procarionota que contiene el vector de la invención.

5 En otra realización de la presente invención, se proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende: (a) cultivar una célula huésped eucariota diseñada para expresar un ácido nucleico compuesto por una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención y (b) recuperar el anticuerpo.

10 En otra realización de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de la invención, un compuesto conjugado de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, para utilizar en el tratamiento de un trastorno inmunitario o un cáncer en un paciente que lo necesita.

15 Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos que contienen dominios CH2 modificados (o variantes) o dominios Fc enteros (denominados colectivamente como "variantes de los polipéptidos" o "variantes de los polipéptidos Fc") que incluyen sustituciones de aminoácidos que aumentan la unión a FcγRIIB y/o disminuyen la unión a FcγRIIA en comparación con la unión de un CH2 (SEC. ID N°: 2) o de una región Fc (SEC. ID N°: 1) tipo silvestre. Un polipéptido de la divulgación puede ser un monómero o un multímero (p. ej., dímero o tetrámero), donde cada unidad monomérica consta de uno o más dominios CH2 o Fc. Un polipéptido de la divulgación es normalmente un anticuerpo o una proteína de fusión Fc que contiene una variante del dominio CH2 o Fc de la divulgación. Una variante del dominio CH2 o Fc de la presente divulgación incluye generalmente una o más sustituciones en la posición 263, la posición 266, la posición 273 y la posición 305, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat. Estas posiciones de aminoácidos se indican mediante asterisco (*), daga (†), daga doble (‡) y el signo de número (#), respectivamente, en la figura 2.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos que contienen una variante del dominio CH2 que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. En relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, los polipéptidos dados a conocer pueden comprender una o más sustituciones elegidas entre: (a) una sustitución V263 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA; (b) una sustitución V266 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA; y c) una sustitución V273 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA.

30 También damos a conocer polipéptidos que comprenden una o más sustituciones elegidas entre V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W, en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. En aspectos específicos de la divulgación, la una o más sustituciones del dominio CH2 se pueden elegir entre V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos que contienen una variante del dominio CH2 que tiene hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 sustituciones, o una sola sustitución de aminoácido en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, que incluye una o más sustituciones elegidas entre: (a) una sustitución V263 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA; (b) una sustitución V266 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA; y c) una sustitución V273 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIA.

40 Los polipéptidos de la divulgación también pueden contener una variante del dominio CH2 que tenga hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 sustituciones, o una sola sustitución de aminoácido, en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, que incluye una o más sustituciones elegidas entre V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W. En aspectos específicos de la divulgación la una o más sustituciones del dominio CH2 se pueden elegir entre V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y.

45 Como se trata en detalle en este documento, el dominio CH2 es un componente del dominio Fc de un anticuerpo. Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación se proporcionan polipéptidos que comprenden un dominio Fc, dicho dominio Fc comprende un dominio CH2 de la divulgación. En algunos aspectos de la divulgación, el dominio Fc puede tener hasta 20, hasta 15, hasta 12, hasta 10, hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5 o hasta 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio CH2 del dominio Fc de SEC. ID N°: 1. En general, el dominio Fc del polipéptido puede tener al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el dominio Fc de SEC. ID N°: 1.

50 Los expertos en la materia apreciarán que los dominios Fc dados a conocer, pueden contener una o más de las sustituciones de CH2 descritas en este documento. Por lo tanto, se proporcionan polipéptidos que incluyen los que contienen una sustitución V263 (p. ej., V263L), una sustitución V266 (p. ej., V266L), una sustitución V273 (p. ej., V273E, V273F, V273L, V273M, V273S o V273Y), o una sustitución V305 (p. ej., V305K o V305W).

También damos a conocer polipéptidos que contienen una variante del dominio CH2 que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, y que tiene en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2 una o más sustituciones elegidas entre: una sustitución V263 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIIA; y una sustitución V273 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIIA.

Además, describimos polipéptidos que contienen una variante del dominio CH2 que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, y que tiene en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2: la sustitución V263L; y/o una sustitución V273 elegida entre V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y.

Además damos a conocer polipéptidos que contienen una variante del dominio CH2 que tiene hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 sustituciones, o una sola sustitución de aminoácido, en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, que incluye una o más sustituciones elegidas entre: una sustitución V263 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIIA; una sustitución V266 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIIA; y una sustitución V273 que aumenta la afinidad hacia FcγRIIB y disminuye la afinidad hacia FcγRIIIA.

Los polipéptidos de la divulgación pueden también contener una variante de los polipéptidos del dominio CH2 que tenga hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 sustituciones, o una sola sustitución de aminoácido, en comparación con un dominio de CH2 de SEC. ID N°: 2, que incluye una o más sustituciones elegidas entre: la sustitución V263L y/o una sustitución V273 elegida entre V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S y V273Y.

Se sabe que los dominios Fc median las funciones efectoras de Fc, como se describe en la Sección 3.5. Por consiguiente, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden además una o más sustituciones o combinaciones de sustituciones que modifican la función efectora de Fc. Normalmente, las funciones efectoras de Fc que se pueden modificar son: a) la disminución o el aumento en la unión a FcRN; (b) la disminución o el aumento en la unión a FcγRI; (c) la disminución o el aumento en la unión a FcγRIIA o FcγRIIB; d) la disminución o el aumento en la unión a FcγRIIIA; o (e) una combinación de dos, tres, cuatro o todas las anteriores.

Una sustitución de ejemplo que se sabe que modifica las funciones efectoras de Fc es la sustitución M428L de Fc, que se puede producir en combinación con la sustitución T250Q de Fc. Además, un dominio Fc de la divulgación puede incluir una o más sustituciones adicionales elegidas de la tabla 1, en comparación con el dominio Fc de SEC. ID N°: 1.

En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos que son anticuerpos, que se tratan con más detalle en la Sección 3.1. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados. En realizaciones típicas de la divulgación, un anticuerpo se une específicamente a CD40, CD25, CD3, una molécula de HLA, una molécula coestimuladora, una citocina (por ejemplo, TNF-α o IL-2), una quimiocina, una molécula de adhesión (p. ej., la integrina α4), un marcador de activación, o una proteína inmunomoduladora. La molécula coestimuladora puede ser CD28, PD-1, CTLA-4, CD80, CD86, TIM3, OX40, 4-1BB, GITR, CD27, B7-H4 o DC-SIGN. En algunos aspectos de la divulgación, la proteína inmunomoduladora puede ser una molécula de la superficie celular. Alternativamente, en otros aspectos de la divulgación la proteína inmunomoduladora puede ser una molécula soluble.

En ciertos aspectos de la divulgación, el anticuerpo se puede unir específicamente a CD25. Alternativamente, en otros aspectos de la divulgación el anticuerpo se puede unir específicamente a CD40.

Los polipéptidos de la divulgación también incluyen proteínas de fusión Fc en las que el dominio CH2 es parte de un dominio Fc unido operativamente a al menos una pareja de fusión. Las proteínas de fusión Fc se tratan en detalle en la Sección 3.3. En dichas proteínas Fc, dicha al menos una pareja de fusión puede ser el dominio extracelular ("ECD") del receptor de TNF II; el primer ECD del antígeno-3 asociado a la función linfocitaria (LFA-3); el ECD de la molécula-4 asociada a linfocitos T citotóxicos humanos (CTLA-4); el extremo C-terminal de la región de unión al ligando de la proteína accesoria IL-1R; el extremo N-terminal del ECD de IL-1R1; el péptido mimético de trombopoyetina (TPO); el ECD de CTLA-4 con las dos sustituciones de aminoácidos L104E y A29Y; y los ECD del receptor 1 de VEGF y/o el ECD del receptor 2 de VEGF.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos conjugados que comprenden polipéptidos, de la divulgación ligados a una molécula efectora o a un marcador detectable. Los compuestos conjugados se tratan más adelante en la Sección 3.6. En algunos aspectos de la divulgación el compuesto conjugado puede comprender un polipéptido unido a un marcador detectable, como un compuesto radiactivo, un compuesto fluorescente, una enzima, un sustrato, un marcador epítipo o una toxina. En algunos aspectos de la divulgación el compuesto conjugado puede comprender un polipéptido unido a una molécula efectora, como un agente citotóxico. Los expertos en la

materia apreciarán los diferentes agentes citotóxicos que se pueden unir a los polipéptidos de la divulgación, que incluyen una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enediyina, una duocarmicina, un maytansinoide o un alcaloide de la vinca. Otros ejemplos de agentes citotóxicos son anti-tubulinas, AFP, MMAF o MMAE.

5 La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable o un compuesto conjugado de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento se discuten en detalle en la Sección 3.7.

10 En este documento se proporcionan ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la divulgación, al igual que vectores que contienen ácidos nucleicos. Además, en el presente documento se proporcionan células huésped procarióticas y eucariotas transformadas con un vector que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido dado a conocer, así como células huésped eucariotas (tales como mamíferos) diseñadas para expresar las secuencias de nucleótidos. También se proporcionan métodos para producir polipéptidos, mediante el cultivo de células huésped y la recuperación de los polipéptidos, y se analizan más adelante en la Sección 3.4.

15 Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos de la divulgación son útiles en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos como un trastorno inmunitario o cáncer, para los que sería adecuado administrar a un paciente que lo necesita, un polipéptido, una composición farmacéutica o un compuesto conjugado de la divulgación apropiados.

20 En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido puede ser un anticuerpo anti-CD40 útil para el tratamiento de un cáncer. En algunos aspectos de la divulgación, el cáncer puede ser un cáncer hematológico elegido opcionalmente entre leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T, linfoma no hodgkiniano, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi. En realizaciones particulares, el cáncer es un tumor sólido, elegido opcionalmente entre cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer renal. Los ejemplos de secuencias VL y VH de un anticuerpo anti-CD40 se proporcionan como SEC. ID N°: 3 y SEC. ID N°: 4, respectivamente. En aspectos específicos de la divulgación el anticuerpo anti-CD40 puede ser un anticuerpo multiespecífico.

25 También damos a conocer un polipéptido que es un anticuerpo anti-CD20 útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es artritis reumatoide o esclerosis múltiple. Los ejemplos de secuencias VL y VH de un anticuerpo anti-CD20 se proporcionan como SEC. ID N°: 5 y SEC. ID N°: 6, respectivamente.

30 También damos a conocer un polipéptido que es un anticuerpo anti-CD25 útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es esclerosis múltiple, asma, psoriasis, uveítis, inflamación ocular o rechazo de trasplante de órgano o de un cáncer que es leucemia de linfocitos T asociada al virus linfotrópico de linfocitos T humano tipo 1. Los ejemplos de secuencias VL de un anticuerpo anti-CD25 incluyen SEC. ID N°: 7 y SEC. ID N°: 9. Los ejemplos de secuencias VL de un anticuerpo anti-CD25 incluyen SEC. ID N°: 8 y SEC. ID N°: 10.

35 También damos a conocer un polipéptido que es un anticuerpo anti-TNF útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o psoriasis en placa. Los ejemplos de secuencias VL de un anticuerpo anti-TNF α incluyen SEC. ID N°: 11 y SEC. ID N°: 13. Los ejemplos de secuencias VL de un anticuerpo anti-TNF α incluyen SEC. ID N°: 12 y SEC. ID N°: 14.

40 También damos a conocer un polipéptido que es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es artritis reumatoide o enfermedad de Castleman. Los ejemplos de secuencias VL y VH de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 se proporcionan como SEC. ID N°: 15 y SEC. ID N°: 16, respectivamente. El polipéptido también puede ser un anticuerpo anti-integrina- $\alpha 4$ útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es la esclerosis múltiple. En algunos aspectos de la divulgación el polipéptido puede ser un anticuerpo anti-IL-1 útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es Síndromes Periódicos Asociados a Criopirina ("CAPS"). Los ejemplos de secuencias VL y VH de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 se proporcionan como SEC. ID N°: 17 y SEC. ID N°: 18, respectivamente. El polipéptido también puede ser un anticuerpo anti-BAFF útil para el tratamiento de un trastorno inmunitario que es el lupus eritematoso sistémico o la alergia. Los ejemplos de secuencias VL y VH de un anticuerpo anti-BAFF se proporcionan como SEC. ID N°: 19 y SEC. ID N°: 20, respectivamente.

45 Una apreciación más completa de las diversas invenciones dadas a conocer aquí, y muchas de las ventajas de las mismas, se proporciona en la descripción detallada que sigue.

50 Según se usa en toda la memoria y las reivindicaciones adjuntas, los términos y expresiones siguientes pretenden tener los significados siguientes:

Los artículos indefinidos "un" y "una" y los artículos definidos "el" y "la" pretenden abarcar tanto el singular como el plural, a menos que el contexto en el que se emplean indique claramente lo contrario.

5 "Al menos uno(a)" y "uno(a) o más" se utilizan indistintamente para dar a entender que el artículo puede incluir uno o más de los elementos enumerados.

10 A menos que se indique lo contrario, se debe entender que está previsto que todos los números que expresan cantidades, proporciones y propiedades numéricas de ingredientes, condiciones de reacción y demás, utilizados en la memoria y las reivindicaciones pueden ser modificados en todos los casos mediante la expresión "aproximadamente".

5. Breve descripción de las figuras

15 La FIGURA 1 proporciona una representación esquemática de una IgG natural. Los enlaces disulfuro están representados por líneas gruesas entre los dominios CH1 y CL y los dos dominios CH2. V es un dominio variable; C es un dominio constante; L significa cadena ligera y H significa cadena pesada.

FIGURAS 2A-2B. La FIGURA 2A proporciona la secuencia de un dominio Fc tipo silvestre, de la IgG1 humana (SEC. ID N°: 1). Dentro del dominio Fc el dominio CH2 (cuya secuencia es

20 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK; SEC. ID N°: 2) está subrayado
doble y el dominio CH3 (cuya secuencia es
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG

25 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SEC. ID N°: 21) está en negrita. Los residuos 263, 266, 273 y 305 están indicados con asterisco (*), daga (†), daga doble (‡) y el signo de número (#), respectivamente. La FIGURA 2B muestra las secuencias de aminoácidos y la numeración de los aminoácidos en los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3. La secuencia de longitud completa de los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 en la FIGURA 2B se conoce como SEC. ID N°: 38.

30 La FIGURA 3 proporciona un esquema de complejos utilizados para medir la unión de polipéptidos de la divulgación a los receptores Fc.

La FIGURA 4 proporciona las curvas de titulación FACS y las mediciones de EC₅₀ para la unión de hu1D10 tipo silvestre a (A) FcγRIIB1 y (B) FcγRIIIA.

La FIGURA 5 proporciona un resultado de clasificación FACS representativo

35 La FIGURA 6 proporciona un diagrama que muestra las proporciones de enriquecimiento en clones individuales significativamente aumentadas para la unión a FcγRIIB y disminuidas para la unión a FcγRIIIA.

La FIGURA 7 proporciona posiciones y sustituciones que se identificó que habían aumentado notablemente la unión a FcγRIIB y disminuido la unión a FcγRIIIA. Las proporciones de enriquecimiento en cada mutante están tabuladas.

40 La FIGURA 8 proporciona datos de FACS de un solo punto para la unión de polipéptidos de la divulgación a FcγRIIB.

La FIGURA 9 proporciona datos de FACS de un solo punto para la unión de polipéptidos de la divulgación a FcγRIIIA.

45 FIGURAS 10A-10B: proporcionan datos confirmatorios que muestran que los polipéptidos de la divulgación presentan mayor unión máxima a FcγRIIB que el anticuerpo de tipo silvestre. La FIGURA 10A muestra las curvas de unión del WT (tipo silvestre) y de las variantes de las regiones Fc a FcγRIIB; la FIGURA 10B muestra la EC₅₀ de la unión para cada variante y la cantidad de veces respecto a la unión del tipo silvestre.

FIGURAS 11A-11B: proporcionan datos confirmatorios que muestran que los polipéptidos de la divulgación presentan mayor unión máxima a FcγRIIIA que el anticuerpo de tipo silvestre. La FIGURA 11A muestra las curvas de unión del WT (tipo silvestre) y de las variantes de las regiones Fc a FcγRIIIA; la FIGURA 11B muestra la EC₅₀ de la unión para cada variante y la cantidad de veces respecto a la unión del tipo silvestre.

50 La FIGURA 12 proporciona datos de FACS de pruebas de los polipéptidos de la divulgación con un ensayo de ADCC no radiactivo.

FIGURAS 13A-13D. La FIGURA 13A proporciona datos que muestran el porcentaje de citotoxicidad graficado frente a la concentración de IgG para determinar la EC₅₀. La FIGURA 13B muestra mutantes ascendentes de FcγRIIB que tienen cierta actividad ADCC, aunque inferior a la del tipo silvestre. La FIGURA 13C muestra polipéptidos con poca o ninguna actividad ADCC. La FIGURA 13D compara los polipéptidos hu1D10 no-ADCC con sustituciones previamente conocidas que dan como resultado una disminución en la unión a FcγRIIIA (S267E, L328F, "SELF" doble mutante).

60 FIGURAS 14A-14B. La FIGURA 14A proporciona resultados para la inducción de ADCC para polipéptidos de la divulgación mediante un ensayo de liberación de cromo. La FIGURA 14B proporciona la clave de los símbolos de la Figura 14A.

FIGURAS 15A-15C: proporcionan resultados para la activación de células dendríticas por los polipéptidos de la divulgación utilizando células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos. La FIGURA 15A muestra la activación de células dendríticas por variantes que inducen ADCC. La FIGURA 15B muestra la

activación de células dendríticas por variantes que no inducen ADCC . La FIGURA 15C muestra la EC₅₀ para la inducción de IL-12.

La FIGURA 16 muestra las variantes de Fc con menor actividad ADCC con unión a FcγRIIB conservada/mejorada en negrita.

5

6. Descripción detallada

6.1. Variantes de los polipéptidos Fc

10 Los dominios Fc de la inmunoglobulina están implicados en la función de unión no antigénica y tienen varias funciones efectoras mediadas por la unión de moléculas efectoras. Como se ilustra en la Figura 1, los dominios Fc están compuestos por dos dominios principales, el dominio CH2 y el dominio CH3, y tienen una pequeña región bisagra N-terminal al dominio CH2. La presente divulgación proporciona polipéptidos que contienen dominios CH2 modificados (y dominios Fc modificados que contienen dominios CH2 modificados), denominados colectivamente en este documento como variantes de los polipéptidos, variantes de Fc, o simplemente variantes o polipéptidos. Las
15 variantes de los polipéptidos son generalmente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (denominados colectivamente en este documento, variantes de anticuerpos) o proteínas de fusión Fc.

Según se usa en este documento, la numeración de los residuos de aminoácidos de los anticuerpos se realiza según la nomenclatura EU de Kabat a menos que se indique lo contrario.

20

En este documento, la expresión "dominio Fc" se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. Aunque los límites generalmente aceptados del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, se define generalmente que el dominio Fc de la cadena pesada de la IgG humana se extiende desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la misma. En algunos aspectos de la divulgación, las variantes pueden comprender solo porciones del dominio Fc y pueden incluir, o no, el extremo carboxilo-terminal. El dominio Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, CH2 y CH3. Las variantes de los polipéptidos Fc de la divulgación incluyen habitualmente un dominio CH2 y muchas veces también incluyen un dominio CH3.

25

30

Según se usa en este documento, el "dominio CH2" (también denominado dominio "Cγ2") comprende generalmente el tramo de residuos que se extiende desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340 en un dominio Fc (por ejemplo, en el dominio Fc de la IgG humana). El dominio CH2 es único en el sentido de que no está emparejado estrechamente con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas por N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta.

35

Según se usa en este documento, el "dominio" CH3 (también conocido como "dominio Cγ3") comprende generalmente el tramo de residuos C-terminal a un dominio de CH2 en un dominio Fc (por ej. desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 447 de la región Fc de la IgG humana).

40

Las expresiones "receptor Fc" y "FcR" se usan para describir un receptor que se une a un dominio Fc (p. ej. el dominio Fc de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo). En algunas realizaciones de la presente invención se contemplan específicamente las porciones de los receptores Fc. En aspectos preferidos de la divulgación, el FcR puede ser un FcR humano de secuencia natural. En otros aspectos preferidos de la divulgación, el FcR también puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. Otros FcR, inclusive los que se identificarán en el futuro, están comprendidos en el término "FcR" de este documento. El término también incluye el receptor FcRn neonatal.

50

55 Los polipéptidos de la divulgación comprenden una variante del dominio Fc que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la totalidad o parte de una región constante de inmunoglobulina humana, preferentemente un dominio C de IgG.

55

60 Se han publicado numerosas secuencias para regiones C humanas; véase, por ejemplo, Clark, 1997, Chem. Immunol. 65:88-110. Otras secuencias para las cadenas pesadas de inmunoglobulina humana se pueden obtener de las bases de datos SwissProt y PIR utilizando el software Lasergene (DNASar Limited, Londres, Reino Unido) con los números de acceso A93433, B90563, A90564, B91668, A91723 y A02146 para la región C de la cadena Igy-1 humana, A93906, A92809, A90752, A93132, A02148 para la región C de la cadena Igy-2 humana, A90933, A90249, A02150 para la región C de la cadena de Igy-4 humana, y A23511 para la región C de la cadena C de Igy-3

60

humana. Un ejemplo de dominio Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 1.

En varios aspectos de la divulgación, la secuencia de aminoácidos de la variante del dominio Fc puede compartir al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la referencia de cualquiera de los dominios Fc anteriores. En aspectos preferidos de la divulgación, el dominio Fc de referencia puede comprender la SEC. ID N°: 1.

Las comparaciones de secuencias se realizan generalmente comparando secuencias en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual generalmente de 12 residuos contiguos que se compara con una secuencia de referencia. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las secuencias respectivas. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (programa Geneworks de Intelligentics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, EE.UU.) o por inspección y la mejor alineación (es decir, la que resulta en el porcentaje más alto de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos elegidos. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como por ejemplo los dados a conocer por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25(17):3389-402.

La presente divulgación proporciona polipéptidos que comprenden un dominio Fc modificado en el que la unión del polipéptido a un primer receptor Fc, por ejemplo, FcγRIIB, aumenta en comparación con la del dominio Fc de tipo silvestre, y la unión del polipéptido a un segundo receptor de Fc, por ejemplo, FcγRIIA, disminuye en comparación con la de un anticuerpo que tiene un dominio Fc de tipo silvestre. El polipéptido puede ser un anticuerpo o una proteína de fusión Fc.

Las variantes de los polipéptidos Fc pueden contener una única sustitución que da como resultado un aumento de la unión a FcγRIIB y una disminución de la unión a FcγRIIA, en comparación con la de un polipéptido que tiene un dominio Fc de tipo silvestre.

Las variantes de los polipéptidos Fc pueden contener una variante del dominio-2 de región constante de cadena pesada ("CH2") que tiene al menos una sustitución elegida entre V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W, en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. La variante del dominio CH2 tiene preferentemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. En diversos aspectos de la divulgación, el dominio CH2 puede incluir al menos una sustitución elegida entre V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y.

En diversos aspectos de la divulgación, la variante del dominio CH2 puede tener en total hasta 20, hasta 15, hasta 12, hasta 10, hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5 o hasta 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. En algunos aspectos de la divulgación, el dominio CH2 puede tener no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3 o no más de 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2.

Las variantes de los polipéptidos Fc pueden comprender una variante de la región Fc que contenga un dominio CH2 que tenga al menos una sustitución elegida entre V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W en comparación con un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2. La variante de la región Fc tiene preferentemente al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la región Fc de SEC. ID N°: 1. En diversos aspectos de la divulgación, el dominio CH2 puede incluir al menos una sustitución elegida entre V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y.

En algunos aspectos de la divulgación, la variante del dominio de la región Fc puede tener en total hasta 20, hasta 15, hasta 12, hasta 10, hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5 o hasta 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc de SEC. ID N°: 1. En algunos aspectos de la divulgación, la variante de la región Fc puede tener no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3 o no más de 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la región Fc de SEC. ID N°: 1.

Las variantes de los polipéptidos de la divulgación pueden ser anticuerpos o proteínas de fusión Fc. Por ejemplo, pero no exclusivamente, una proteína de fusión Fc puede ser un anticuerpo que se exprese de manera recombinante como una proteína de fusión, por ejemplo, con una proteína citocina, una proteína toxina u otra proteína bioactiva. En otros aspectos de la divulgación, una proteína de fusión Fc puede contener un dominio Fc de un anticuerpo, tal como una variante de los polipéptidos del dominio Fc como el que se describe en este documento,

expresado de forma recombinante como una proteína de fusión con una pareja de fusión. En otros aspectos de la divulgación, una proteína de fusión Fc puede contener alternativamente un dominio CH2 o CH3 de una región Fc, como una variante del dominio CH2 como la que se describe en este documento, expresada de forma recombinante como una proteína de fusión con una pareja de fusión. Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser conjugados anticuerpo-fármaco. Por ejemplo, pero no exclusivamente, las variantes de los anticuerpos se pueden conjugar a moléculas de toxinas o compuestos bioactivos de moléculas pequeñas. Los ejemplos de anticuerpos y de proteínas de fusión se describen en las Secciones.

Las variantes de los dominios Fc de la divulgación pueden comprender (además de las una o más sustituciones que dan lugar a una mayor afinidad por FcγRIIB y menor afinidad por FcγRIIA) una o más sustituciones que impactan en la función efectora.

En un aspecto de la divulgación, la variante del dominio Fc puede contener una o más sustituciones que dan como resultado una menor unión a un FcγR y comprende una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

Por ejemplo, la variante del dominio Fc puede contener una o más sustituciones que dan como resultado una menor unión a un FcγRI y comprende una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 o 329 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

La variante del dominio Fc puede contener una o más sustituciones que resultan en una menor unión a un FcγRII y comprende una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

La variante del dominio Fc de interés puede contener una o más sustituciones que dan como resultado una menor unión a un FcγRIII y comprende una modificación de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

En otro aspecto de la divulgación, la variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcγR alterada, puede contener una o más sustituciones que dan como resultado una mayor unión a FcγR y comprende una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

Por ejemplo, la variante del dominio Fc puede contener una o más sustituciones que dan como resultado una mayor unión a un FcγRIII y, opcionalmente, puede contener además una o más sustituciones que dan como resultado una menor unión a un FcγRII. Un ejemplo de dicha variante comprende la modificación o modificaciones de aminoácidos en la posición o posiciones 298 y/o 333 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

La variante del dominio Fc puede contener una o más sustituciones que resultan en una mayor unión a un FcγRII y comprende una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 337, 340, 378, 398 o 430 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat. Dichas variantes de los dominios Fc con mayor unión a un FcγRII pueden contener además opcionalmente una o más sustituciones que resultan en una menor unión a un FcγRIII y pueden, por ejemplo, comprender una modificación de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 268, 272, 298, 301, 322 o 340 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat.

Aún en otro aspecto, las variantes de los polipéptidos Fc se pueden modificar para aumentar o disminuir sus afinidades de unión al receptor Fc fetal, FcRn, por ejemplo, mediante mutación del segmento de la región constante de la inmunoglobulina en regiones particulares involucradas en las interacciones de FcRn (véase, por ejemplo, WO 2005/123780). Por consiguiente, la divulgación proporciona además un polipéptido que tiene una variante del dominio Fc con afinidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) alterada, donde el polipéptido comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 o 447 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat. Dichas variantes de los dominios Fc con menor unión a un FcRn pueden comprender

una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat. Las variantes de los dominios Fc mencionados previamente pueden, alternativamente, contener una o más sustituciones que dan como resultado una mayor unión a FcRn y comprenden

5 una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 del dominio Fc, donde la numeración de los residuos en el dominio Fc es la del índice EU de Kabat. En aún otros aspectos de la divulgación las variantes de los dominios Fc pueden tener al menos una o más modificaciones que mejoren la afinidad a FcRn, por ejemplo una modificación de uno o más residuos de los aminoácidos 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-

10 436 (por ej. M428L), o una modificación en las posiciones 250 y 428 (por ej. T250Q/M428L), véase, por ejemplo Hinton et al., 2004, J Biol Chem 279(8): 6213-6; publicación PCT N° WO 97/34631; y WO 02/060919. En aspectos particulares de la divulgación, un anticuerpo de la clase IgG se puede mutar de tal manera que al menos uno de los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 de la región constante de la cadena pesada sea sustituido solo, o en cualquiera de sus combinaciones, como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las

15 posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314 y 428, con las posiciones 250 y 428 una combinación específica. Para la posición 250, el residuo de aminoácido de sustitución puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de treonina, que incluye, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 314, el residuo de aminoácido de sustitución puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de

20 leucina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina. Para la posición 428, los residuos de aminoácidos de sustitución pueden ser cualquier residuo de aminoácido distinto de metionina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o

25 tirosina. Dichas mutaciones aumentan la unión del anticuerpo a FcRn, lo que protege al anticuerpo de la degradación y aumenta su vida media.

Otros ejemplos de sustituciones que conducen a la modificación en la función efectora de Fc son las dadas a conocer en la patente de EE.UU. N° 7,632,497. En realizaciones específicas, las sustituciones adicionales se eligen

30 entre las de la Tabla 1, siguiente. La tabla 1 muestra el efecto sobre la unión (aumenta, disminuye o no cambia "nc") al FcγRs indicado para las sustituciones indicadas (Shields et al., 2001, J Biol Chem 276(9):6591-604).

Sustitución	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
E233P	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
L234V	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
L235A	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
P238A	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
S239A	nc	nc	nc	nc	disminuye
I253A	disminuye	nc	nc	nc	nc
S254A	disminuye	nc	nc	nc	nc
R255A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
T256A	nc	nc	aumenta	aumenta	aumenta
E258A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
D265A	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
D265N	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
D265E	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
S267A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
S267G	--	--	nc	nc	disminuye
S267T	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
H268A	nc	nc	aumenta	aumenta	disminuye
E269A	nc	nc	nc	nc	disminuye

ES 2 699 599 T3

Tabla 1					
Sustitución	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
D270A	nc	nc	disminuye	disminuye	disminuye
D270N	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
D270E	--	--	disminuye	disminuye	nc
E272A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
N276A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
D280A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
H285A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
N286A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
K288A	disminuye	nc	nc	nc	nc
K290A	nc	nc	aumenta	aumenta	aumenta
R292A	nc	nc	disminuye	disminuye	nc
E293A	nc	nc	nc	nc	disminuye
E293D	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
Q295A	nc	nc	disminuye	disminuye	disminuye
Y296F	nc	nc	nc	nc	disminuye
N297A	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
S298A	nc	nc	disminuye	disminuye	aumenta
S298T	--	--	disminuye	disminuye	nc
S298N	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
R301A	nc	nc	aumenta	aumenta	disminuye
R301M	--	--	aumenta	aumenta	disminuye
V303A	nc	nc	nc	nc	disminuye
V305A	aumenta	nc	nc	nc	nc
T307A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
L309A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
Q311A	aumenta	nc	nc	nc	nc
D312A	aumenta	nc	nc	nc	nc
N315A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
K317A	aumenta	nc	nc	nc	nc
K322A	nc	nc	aumenta	aumenta	disminuye
K326A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
A327Q	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
A327S	nc	nc	disminuye	disminuye	disminuye
A327G	nc	nc	nc	nc	disminuye
P329A	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye	disminuye
P331A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
P331S	--	--	nc	disminuye	disminuye
E333A	nc	nc	nc	nc	aumenta

Tabla 1					
Sustitución	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
E333Q	--	--	disminuye	disminuye	nc
E333N	--	--	disminuye	disminuye	disminuye
E333D	--	--	--	--	aumenta
K334A	nc	nc	nc	nc	aumenta
K334R	--	--	nc	aumenta	disminuye
K334Q	--	--	nc	nc	aumenta
K334E	--	--	disminuye	nc	aumenta
K334V	--	--	aumenta	nc	aumenta
S337A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
K338A	nc	nc	nc	nc	disminuye
K338M	--	--	nc	nc	disminuye
A339T	nc	nc	nc	nc	aumenta
K360A	aumenta	nc	nc	nc	nc
Q362A	aumenta	nc	nc	nc	nc
D376A	nc	nc	nc	nc	disminuye
A378Q	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
E380A	aumenta	nc	nc	nc	nc
E382A	aumenta	nc	nc	nc	nc
K414A	nc	nc	disminuye	disminuye	nc
S415A	disminuye	nc	nc	nc	nc
S424A	aumenta	nc	nc	nc	nc
E430A	nc	nc	aumenta	aumenta	nc
H433A	disminuye	nc	nc	nc	nc
N434A	aumenta	nc	nc	nc	nc
H435A	disminuye	nc	nc	nc	nc
Y436A	disminuye	nc	nc	nc	nc

En ciertos aspectos de la divulgación las variantes de las regiones Fc de la divulgación pueden tener una o más sustituciones en sus regiones bisagra (la porción de SEC. ID N°: 1 N-terminal al dominio CH2) que afectan la función efectora, por ejemplo, como se describe en WO2009/006520, particularmente en la posición del aminoácido estipulada en la reivindicación 7 de WO2009/006520. En aspectos específicos de la divulgación la región bisagra puede incluir al menos una de las combinaciones de sustituciones designadas de a a ff como se estipula en la reivindicación 8 de WO2009/006520.

6.2. Variantes de anticuerpos

Los polipéptidos de la divulgación pueden ser anticuerpos que contienen las variantes de las secuencias de Fc descritas en este documento, denominadas "variantes de anticuerpos".

En ciertos aspectos de la divulgación las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" según se usa en este documento no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridomas. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, que incluye cualquier clon eucariótico, procariótico o fágico y no al método por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales útiles en relación con la presente divulgación se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en el área, que incluyen el uso de las tecnologías de hibridomas, recombinante y de presentación en fago, o una combinación de las mismas. Las variantes de los Fc de

la divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. La expresión anticuerpo "quimérico" según se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina que no es humana, como un anticuerpo de rata o ratón, y de regiones constantes de la inmunoglobulina humana, elegidas normalmente de una plantilla de inmunoglobulina humana. Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos son conocidos en el área. Véase, por ejemplo Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, Biotechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J Immunol Methods 125:191-202; patentes de Estados Unidos N° 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos humanizados. Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otros subdominios de anticuerpos que se unen a la diana) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá prácticamente todo de al menos uno y por lo general dos, dominios variables, en los cuales todas o prácticamente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o prácticamente todas las regiones FR son las de una secuencia de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de la región constante de una inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la humanización de anticuerpos son conocidos en el área. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; las patentes de EE.UU. N°: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370 para Queen et al.; EP239400; la publicación PCT WO 91/09967; la patente de Estados Unidos N° 5,225,539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol Immuno, 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. SCI. 91:969-973; y la patente de EE.UU. N° 5,565,332.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos humanos. Pueden ser deseables variantes de los Fc completamente "humanas" para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Según se usa en este documento, "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de colecciones de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos se pueden preparar por diversos métodos conocidos en el área que incluyen métodos de presentación in vivo utilizando colecciones de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse las patentes de EE.UU. N° 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; las patentes de EE.UU. N° 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; y 5,939,598. Además, empresas como Medarex (Princeton, NJ), Astellas Pharma (Deerfield, IL), Amgen (Thousand Oaks, CA) y Regeneron (Tarrytown, NY) pueden estar ocupadas en proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno en particular utilizando una tecnología similar a la descrita precedentemente. Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo en particular mediante la utilización de una técnica conocida como "selección guiada". En este método un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa de guía para la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., 1988, Biotechnology 12:899-903).

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación se pueden primatizar. La expresión "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que contiene regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para la producción de anticuerpos primatizados son conocidos en el área. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5,658,570; 5,681,722; y 5,693,780.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, a menudo, humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Los ejemplos no limitantes de dianas antigénicas de los anticuerpos biespecíficos incluyen una proteína de la superficie celular, un receptor, una subunidad del receptor, un antígeno específico del tejido, una proteína derivada de virus, una proteína de envoltura codificada viralmente, una proteína derivada de bacteria o una proteína de la superficie bacteriana, etc.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación pueden ser inmunoglobulinas con dominio variable dual ("DVD") ("DVD-Ig") (véase, Gu & Ghayur, 2012, Methods in Enzymology 502:25-41). Una DVD-Ig combina los dominios variables de unión a la diana de dos anticuerpos monoclonales a través de conectores para crear un agente único tetravalente dirigido a dos dianas. Los conectores adecuados para utilizar en las cadenas ligeras de las DVD de la presente divulgación son los identificados en la tabla 2.1 en la página 30 de Gu & Ghayur, 2012, Methods in Enzymology 502:25-41: los conectores de cadena kappa corta ADAAP (SEC. ID N°: 22) (murino) y TVAAP (SEC. ID N°:

23) (humano); los conectores de cadena κ larga ADAAPTVSIFP (SEC. ID N°: 24) (múrido) y TVAAPSVFIFPP (SEC. ID N°: 25) (humano); el conector de cadena λ corto QPKAAP (SEC. ID N°: 26) (humano); el conector de cadena λ largo QPKAAPSVTLFPP (SEC. ID N°: 27) (humano); el conector GS-corto GGS GG (SEC. ID N°: 28), el conector GS-medio GGS GGG GGS (SEC. ID N°: 29), y el conector GS-largo GGS GGG GGS GGG GGS (SEC. ID N°: 30) (todos los conectores GS son múridos y humanos). Los conectores adecuados para utilizar en las cadenas pesadas de los DVD de la presente divulgación incluyen los identificados en la tabla 2.1 en la página 30 de Gu & Ghayur, 2012, *Methods in Enzymology* 502:25-41: los conectores cortos AKTTAP (SEC. ID N°: 31) (múrido) y ASTKGP (SEC. ID N°: 32) (humano); los conectores largos AKTTAPSVYPLAP (SEC. ID N°: 33) (múrido) y ASTKGPSVFPLAP (SEC. ID N°: 34) (humano); el conector GS-corto GGG GGS (SEC. ID N°: 35), el conector GS-medio GGG GGS GGG GGS (SEC. ID N°: 36), y el conector GS-largo GGG GGS GGG GGS GGG GGS (SEC. ID N°: 37) (todos los conectores GS son múridos y humanos). Preferentemente los conectores humanos se usan para las DVD-Ig humanas o humanizadas.

En la presente divulgación, la DVD-Ig se dirige hacia dos dianas diferentes. Las dianas se pueden elegir entre EGFR, HER2, ErbB3, o cualquier otra diana descrita en Tariq et al., publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0044980, publicada el 24 de febrero de 2011.

Los dominios de unión a la diana de las inmunoglobulinas DVD están normalmente dispuestos en tándem, con un dominio variable apilado sobre otro para formar dominios Fv interior y exterior.

Las variantes de los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos derivatizados. Por ejemplo, pero no de manera limitante, los anticuerpos derivatizados son normalmente modificados por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otras proteínas (véase Sección 0 por una discusión sobre conjugados de anticuerpos), etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no exclusivamente, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, utilizando, por ejemplo, tecnología Ambrx (véase por ejemplo, Wolfson 2006, *Chem. Biol.* 13(10):1011-2).

6.2.1 Dianas de las variantes de los anticuerpos Fc

Prácticamente cualquier antígeno puede ser la diana de los anticuerpos de la divulgación, incluidos, pero no exclusivamente, cor proteínas, subunidades, dominios, motivos y/o epitopos pertenecientes a la lista siguiente de antígenos diana, que incluye tanto factores solubles como citocinas y factores unidos a membrana, incluidos los receptores transmembrana: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, Receptor de adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Ig, ASPÁRTICO, factor natriurético atrial, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1 y B7-2, B7-H, estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3, Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor-3 del complemento (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, cAMP, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina de *Clostridium perfringens*, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor acelerador de desintegración, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), Dhh, digoxina, DNAM-1, Adnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptores de endotelina, Enkefalinas, eNOS, Eot, eotaxina-1, EpCAM, Efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, factor 10a, factor VII, factor VIIIc, Factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimulante del folículo, Fractalkina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8

(Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GITR, Glucagón, Glut 4, glucoproteína 10b/IIIa (GP 10b/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor liberador de la hormona del crecimiento, Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glucoproteína gB de la envoltura de HCMV, glucoproteína gH de la envoltura de HCMV, HCMV UL, factor de crecimiento hematopoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glucoproteína gB del virus del herpes simple (HSV), glucoproteína gD de HSV, HGFA, antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA), HIV gp120, bucle V3 de gp120 de HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona del crecimiento humana (HGH), HVEM, 1-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGF1BP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón, (INF)-alpha, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, cadena de insulina A, cadena de insulina B, factor de crecimiento semejante a la insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta2, integrina alfa5 (alphaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferon gamma, IP-10, I-TAC, JE, calicreína 2, calicreína 5, calicreína 6, calicreína 11, calicreína 12, calicreína 14, calicreína 15, calicreína 15, calicreína L1, calicreína L2, calicreína L3, calicreína L4, KC, KDR, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1 latente, TGF-1 latente bp1, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, antígeno Lewis-Y, antígeno relacionado a Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, surfactante pulmonar, hormona luteinizante, receptor de linfotóxina Beta, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alpha, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora mulleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3, -4 o -6, Neurturina, factor de crecimiento neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, renina, virus respiratorio sincitial (VSR) F, RSV Fgp, Ret, factores reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINA, albúmina sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glucoproteína 72 asociada a tumor), TARC, TCA-3, receptores de los linfocitos T (por ejemplo, receptor alfa/beta de linfocitos T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina tipo PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta específico para Pan, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, CK-1 de Timo, hormona estimulante de la tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (ligando Apo-2 TRAIL, TL2), TNFSF11 (ligando TRANCE/RANK ODF, ligando OPG), TNFSF12 (ligando Apo-3 TWEAK, ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ligando LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (ligando GITR, ligando AITR, TL6), TNFSF1A (Conectina TNF-a, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD154 ligando de CD40, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (ligando Fas o ligando Apo-1, ligando APT1), TNFSF7 (CD70 ligando de CD27), TNFSF8 (CD153 ligando de CD30), TNFSF9 (ligando 4-1BB ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferrina, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno CA 125 asociado a tumor, marcador tumoral antígeno carbohidrato relacionado a Lewis Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Urocinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos virales, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrands, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

60 Un anticuerpo de la divulgación, que contiene las variantes de los dominios Fc descritos en este documento, puede incluir las secuencias CDR o las secuencias de dominio variable de un anticuerpo denominado "progenitor". En algunas realizaciones, el anticuerpo progenitor y el anticuerpo de la divulgación pueden compartir secuencias similares o idénticas excepto por las modificaciones al dominio Fc como se da a conocer en este documento.

Por ejemplo, un anticuerpo progenitor puede ser sustancialmente similar a rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5,736,137), un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para tratar el linfoma no hodgkiniano; HuMax-CD20, un anti-CD20, actualmente en desarrollo en Genmab, un anticuerpo anti-CD20 se describe en patente de EE.UU. N° 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulada "Variantes de las inmunoglobulinas y sus usos"). Un número de anticuerpos dirigidos a los miembros de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, incluidos EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que sea sustancialmente similar al trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™), actualmente en desarrollo en Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en la patente de EE.UU. N° 4,753,894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (patente de EE.UU. N° 4,943,533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo quimérico anti-EGFR en ensayos clínicos para diversos tipos de cáncer; ABX-EGF (patente de EE.UU. N° 6,235,883), actualmente en desarrollo en Abgenix-ImmuneX-Amgen; HuMax-EGFr (U.S. Ser. N° 10/172,317), actualmente en desarrollo en Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (patente de EE.UU. N° 5,558,864; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al., 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Inmunología Molecular, Cuba (patente de EE.UU. N° 5,891,996; patente de EE.UU. N° 6,506,883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138). En otro aspecto preferido de la divulgación los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath®, Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una gran variedad de anticuerpos o fusiones Fc que son sustancialmente similares a otros productos clínicos y candidatos, incluidos, pero no exclusivamente, murmonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por MedImmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Hemicade™ un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD 147 actualmente en desarrollo en Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 actualmente en desarrollo en Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 actualmente en desarrollo en Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMF1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 actualmente en desarrollo en Antisoma, AngioMab (AS1405), actualmente en desarrollo en Antisoma, HuBC-1, actualmente en desarrollo en Antisoma, Thioplatin (AS1407) actualmente en desarrollo en Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 actualmente en desarrollo en Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo anti-integrina VLA-1 actualmente en desarrollo en Biogen, mAb LTBR, un anticuerpo anti-receptor beta de linfotóxina LTBR actualmente en desarrollo en Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology, J695, un anticuerpo anti-IL-12 actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology y Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B™ un anticuerpo anti-Blys actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., mAbTRAIL-R1, un anticuerpo anti-TRAIL-RI actualmente en desarrollo en Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., Avastin™ (bevacizumab, rhuMab-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF actualmente en desarrollo en Genentech, un anticuerpo anti-familia del receptor HER actualmente en desarrollo en Genentech, anti-factor tisular (ATF), un anticuerpo anti-factor tisular actualmente en desarrollo en Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE actualmente en desarrollo en Genentech, Raptiva™ (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a actualmente en desarrollo en Genentech y Xoma, anticuerpo MLN-02 (antiguamente LDP-02), actualmente en desarrollo en Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 actualmente en desarrollo en Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, actualmente en desarrollo en Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanase I actualmente en desarrollo en Genmab y Medarex y Oxford GcoScience, HuMax-Lymphoma, actualmente en desarrollo en Genmab y Amgen, HuMax-TAC, actualmente en desarrollo en Genmab, IDEC-131 y anticuerpo anti-CD40L actualmente en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 actualmente en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 actualmente en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD23 actualmente en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de la migración de los macrófagos (MIF) actualmente en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico actualmente en desarrollo en Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR actualmente en desarrollo en Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 actualmente en desarrollo en Imclone,

- anticuerpos anti-cadherina VE actualmente en desarrollo en Imclone, CEA-Cide™ (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) actualmente en desarrollo en Immunomedics, LymphoCide™ (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 actualmente en desarrollo en Immunomedics, AFP-Cide, actualmente en desarrollo en Immunomedics, MyelomaCide, actualmente en desarrollo en Immunomedics, LkoCide, actualmente en desarrollo en Immunomedics, ProstaCide, actualmente en desarrollo en Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 actualmente en desarrollo en Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 actualmente en desarrollo en Medarex, MDX-070 actualmente en desarrollo en Medarex, MDX-018 actualmente en desarrollo en Medarex, Osidem™ (IDM-1), y el anticuerpo anti-Her2 actualmente en desarrollo en Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, un anticuerpo anti-CD4 actualmente en desarrollo en Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 actualmente en desarrollo en Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNF α actualmente en desarrollo en Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina actualmente en desarrollo en Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (CD54) actualmente en desarrollo en MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) actualmente en desarrollo en MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 actualmente en desarrollo en Protein Design Labs, HuZAF™, un anticuerpo anti-interferón gamma actualmente en desarrollo en Protein Design Labs, Anti-integrina $\alpha 5\beta 1$, actualmente en desarrollo en Protein Design Labs, anti-IL-12, actualmente en desarrollo en Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-EP-CAM actualmente en desarrollo en Xoma y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 actualmente en desarrollo en Xoma.
- En un aspecto de la divulgación las variantes de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o en indicaciones de trasplante. Los antígenos diana y productos clínicos y candidatos que son pertinentes para dichas enfermedades incluyen, pero no exclusivamente, anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ como LDP-02, anticuerpos anti-integrina beta2 como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 como OKT3, SMART anti-CD3, anticuerpos anti-CD4 como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD 14 como IC14, anticuerpos anti-CD 18, anticuerpos anti-CD23 como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 como IDEC-114, anticuerpos anti-CD 147 como ABX-CBL, anticuerpos anti-selectina-E como CDP850, anticuerpos anti-gp11b/IIIa como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 como ICM3, anticuerpos anti-ICE como VX-740, anticuerpos anti-FcRI como MDX-33, anticuerpos anti-IgE como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma, anticuerpos anti-TNF (TNF, TNF α , TNF β , TNF-alfa) como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, y anticuerpos anti-VLA-4 como Antegren.
- Los ejemplos de anticuerpos que pueden ser diseñados para incorporar las variantes de las regiones Fc de la divulgación se estipulan en la tabla 2 a continuación:

Anticuerpo diana y nombre	Cadena	Identificador de secuencia	Secuencia
Anti-CD40 (S2C6)	VL	SEC. ID N°: 3	DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSLVHSN GNTFLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSQVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTT VPWTFGGGTKLEIQ
	VH	SEC. ID N°: 4	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGY YIHIMVKQSKGHSLEWIGRVIPNNGGTSYNQK KFKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC AREGIYWWGHGTTLVSS
Anti-CD20 (rituximab)	VL	SEC. ID N°: 5	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIH WFQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG GGTKLEIK

Tabla 2			
Anticuerpo diana y nombre	Cadena	Identificador de secuencia	Secuencia
	VH	SEC. ID N°: 6	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS YNMHVVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE:DSAVY YCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
Anti-CD25 (daclizumab)	VL	SEC. ID N°: 7	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCSASSISYMH WYQQKPGKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSG SGTEFTLTISLQDDFATYYCHQRSTYPLTFG QGTKVEVK
	VH	SEC. ID. N°: 8	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSY RMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTFEYNQK FKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGGGVFDYWGOGTLTVSS
Anti-CD25 (basiliximab)	VL	SEC. ID N°: 9	QIVLTQSPAIMASAPGEEKVTMTCSASSISYMQ WYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGG TKLEIK
	VH	SEC. ID N°: 10	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRY WMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQK FEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHIEDSAVYY CSRDYGYFDFWGGQTTLTVSS
Anti-TNFa (adalimumab)	VL	SEC. ID N°: 11	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASOGIRNYL AWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTF GOGTKVEIK
	VH	SEC. ID N°: 12	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS VEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKVSYLSTASSLDYWGOGTLTVSS
Anti-TNFa (infliximab)	VL	SEC. ID N°: 13	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCTASQSVSNDV VWYQQKPGQSPKMLMYSAFNRYTGVPDRFTG RGYGTDFTFITISSVQAEDLAVYFCQQDYNSPR TFGGGKLEIKR
	VH	SEC. ID N°: 14	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTIYG MNWVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGPEPTYADD FKEIIFAFSLETSASTVFLQINNLKNETATYFC ARERGDAMDYWGOGTSVTVSS

Tabla 2			
Anticuerpo diana y nombre	Cadena	Identificador de secuencia	Secuencia
Anti-IL-6R (tocilizumab)	VL	SEC. ID N°: 15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGNTLPYTFGQ GTKVEIK
	VH	SEC. ID N°: 16	QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGYSITSDH AWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYCARS LARTTAMDYWGQGLVTVSS
Anti-IL-1 (canakinumab)	VL	SEC. ID N°: 17	HIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGS GTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHIQSSSLPFTFGP GTK
	VH	SEC. ID N°: 18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVY GMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNDQYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNGLRAEDTAVY YCARDLRTGPFDYWGQGLVT
Anti-BAFF (belimumab)	VL	SEC. ID N°: 19	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCCGDSLRSYYA SWYQQKPGQAPVLYVYGKNNRPSGIPDRFSGSS GNRPSGIPNRFSGSSGNASLTITGAQAEDEAD YYCSSRDSSGNIHWVFGGTELTVLG
	VH	SEC. ID N°: 20	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNN NAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTAKYSE NFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDTAVY YCARSRDLLLFPFHALLSPWGRGTMVTVSS

- Varios de los anticuerpos descritos en esta sección han sido sometidos a análisis mutacional para mejorar sus propiedades biológicas. Dichos anticuerpos mutantes que tienen propiedades deseables se pueden modificar para incorporar las variantes de los dominios CH2 y las regiones Fc de la divulgación. US 2010/0266613 A1, por ejemplo, da a conocer las variantes de las secuencias V_L y V_H del anticuerpo anti-TNFα adalimumab. Las variantes de los dominios CH2 y las regiones Fc de la divulgación se pueden incorporar en cualquiera de las variantes de los anticuerpos anti-TNFα dadas a conocer en US 2010/0266613 A1. En algunos aspectos de la divulgación, la variante del anticuerpo anti-TNFα puede incluir una o más de las sustituciones de la tabla 5 de US 2010/0266613, es decir, A25W, Q27R, Q27T, I29V, R30Q y L33E en la cadena V_L. En otros aspectos de la divulgación, la variante del anticuerpo anti-TNFα puede comprender una combinación de sustituciones de la tabla 10 de US 2010/0266613, es decir, 129T/A34G, N31T/A34G, R30Q/A34S, R30Q, Q27G/A34G, Q27H/A34S, Q27R/A34S, G28S/A34S, N31T/A34S o N31S/A34S en la cadena V_L, más preferentemente G28S/A34S. El tramo de aminoácidos que abarca desde A25 hasta A34 está en **negrita y subrayado** en la tabla 2 anterior.
- En algunos aspectos de la divulgación, se pueden usar anticuerpos contra las enfermedades infecciosas. Los anticuerpos contra las células eucariotas incluyen anticuerpos dirigidos a células de levaduras, incluidas, pero no exclusivamente, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Plasmodium falciparum* y *Yarrowia lipolytica*.
- También son útiles los anticuerpos contra células fúngicas adicionales, incluidos los antígenos diana asociados a cepas de *Candida* que incluyen *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. lusitanae* y *C. maltosa*, así como especies de *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, y *Penicillium*, entre otros.

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos diana asociados a protozoos incluyen, pero no exclusivamente, los anticuerpos asociados a *Trypanosoma*, especies de *Leishmania* incluidas *Leishmania donovani*; *Plasmodium* spp., *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, y *Cyclospora cayetanensis*.

Los anticuerpos contra antígenos procarióticos también son útiles, incluidos los anticuerpos contra bacterias adecuadas como procariotas patógenas y no patógenas por ejemplo, pero no exclusivamente, *Bacillus* incluido el *Bacillus anthracis*; *Vibrio*, p. ej., *V. cholerae*; *Escherichia*, p. ej., *E. coli* enterotoxigénica, *Shigella*, por ejemplo, *S. dysenteriae*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhi*; *Mycobacterium* por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Clostridium*, p. ej. *C. botulinum*, *Clostridium tetani*, *C. difficile*, *C. perfringens*; *Corynebacterium*, p. ej. *C. diphtheriae*; *Streptococcus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus*; *Haemophilus*, por ejemplo, *H. influenzae*; *Neisseria*, por ejemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; *Yersinia*, por ejemplo *Y. lamblia*, *Y. pestis*, *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. putida*; *Chlamydia*, p. ej., *C. trachomatis*; *Bordetella*, p. ej., *B. pertussis*; *Treponema*, por ejemplo, *T. paladium*; *B. anthracis*, *Yersinia pestis*, *Brucella* spp., *F. tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *C. botulinum*, *Salmonella* spp., SEB *V. cholerae* toxina B, *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Trichosporon beigeli*, especie *Rhodotorula*, *Hansenula anomala*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria* sp., *Mycoplasma* sp. y similares.

En algunos aspectos, los anticuerpos están dirigidos contra infecciones virales; estos virus incluyen, pero no exclusivamente, ortomixovirus, (por ejemplo, el virus de la gripe), paramixovirus (por ejemplo, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, virus del sarampión), adenovirus, rinovirus, coronavirus, reovirus, togavirus, (por ejemplo, el virus de la rubéola), parvovirus, poxvirus (p. ej., virus de la viruela, virus vaccinia), enterovirus (p. ej., virus de la polio, virus de Coxsackie), virus de la hepatitis (incluidos los virus de la hepatitis A, B y C), herpesvirus (p. ej. virus del herpes simple, varicela-zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), rotavirus, virus de Norwalk, hantavirus, arenavirus, rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia), retrovirus (incluidos VIH, HTLV-I y II), papovavirus (p. ej., virus del papiloma), poliomavirus y picornavirus, y similares.

6.3. Proteínas de fusión Fc

En un aspecto de la divulgación los polipéptidos de la invención pueden ser proteínas de fusión Fc. Las proteínas de fusión basadas en Fc están compuestas generalmente por un dominio Fc de inmunoglobulina que está directamente unido a otro péptido. Como explicó Czajkowsky et al., 2012, EMBO Mol Med 4:1015-1028, la pareja de fusión puede ser cualquier otra molécula proteínica de interés, como un ligando que se activa al interactuar con un receptor de la superficie celular, un antígeno peptídico (Ag) contra un patógeno desafiante o una proteína "cebo" para identificar parejas de unión ensambladas en una micromatriz de proteínas. Con mayor frecuencia, un dominio Fc se fusiona a un polipéptido con potencial terapéutico para dotar a la fusión de un número adicional de propiedades biológicas y farmacológicas beneficiosas. La presencia de un dominio Fc puede incrementar notablemente la vida media plasmática de una proteína, lo que prolonga su actividad terapéutica debido a su interacción con el receptor Fc neonatal de rescate (FcRn; Roopenian & Akilesh, 2007, Nat Rev Immunol 7: 715-725), así como al retraso en la depuración renal de moléculas de mayor tamaño (Kontermann 2011, Curr Opin Biotechnol 22: 868-876). El dominio Fc unido también permite a estas moléculas interactuar con receptores Fc (FcRs) que se encuentran en los inmunocitos (Nimmerjahn & Ravetch, 2008, Nat Rev Immunol 8: 34-47).

En consecuencia, una fusión Fc combina la región Fc de un anticuerpo, y por lo tanto sus funciones efectoras y farmacocinéticas favorables, con la región de unión a la diana de un receptor, ligando, o alguna otra proteína u otro dominio de proteína. El papel de esta última es mediar en el reconocimiento de la diana y, por lo tanto, es funcionalmente análoga a la región variable del anticuerpo. A causa de la superposición estructural y funcional de las fusiones de Fc con anticuerpos, la discusión sobre los anticuerpos en la presente divulgación se extiende a fusiones de Fc a menos que se indique lo contrario.

En aspectos ejemplares de la divulgación, la pareja de fusión de Fc puede ser el dominio extracelular ("ECD") del receptor II de TNF; el primer ECD del antígeno-3 asociado a la función linfocitaria (LFA-3); el ECD de la molécula-4 asociada a linfocitos T citotóxicos humanos (CTLA-4); el extremo C-terminal de la región de unión al ligando de la proteína accesoria IL-1R fusionada al extremo N-terminal del ECD de IL-1RI; el péptido mimético de trombopoyetina (TPO); el ECD de CTLA-4 con las dos sustituciones de aminoácidos L104E y A29Y; o los ECD de los receptores 1 y 2 de VEGF.

Una proteína de fusión Fc de la divulgación, que comprende las variantes de los dominios Fc descritos en este documento, se puede basar en una fusión Fc "progenitora" conocida, como los productos biológicos aprobados descritos en la Tabla 3.

Tabla 3

Denominación común internacional (nombre comercial)	Descripción	Modo de acción	Año e indicación de la primera aprobación de EE.UU.
Etanercept (Enbrel®)	Dominio extracelular (ECD) soluble de 75 kDa del receptor II del factor de necrosis tumoral (TNF) fusionado a Fc de IgG1 humana	Se une a las formas unidas a la membrana y solubles de TNF, reduciendo así las concentraciones de citocinas inflamatorias	1998 Artritis reumatoide
Alefacept (Amevive®)	Primer ECD del antígeno-3 asociado a la función linfocitaria (LFA-3) fusionado al Fc de la IgG1 humana	Se une a CD2; bloquea las interacciones entre LFA en las APC con CD2 en los linfocitos T, inhibiendo así la activación de los linfocitos T	2003 Psoriasis en placa
Abatacept (Orencia®)	ECD de la molécula-4 asociada a los linfocitos T citotóxicos humanos (CTLA-4) fusionado a Fc de la IgG1 humana	Bloquea las interacciones entre CD80 o CD86 en las APC y CD28 en los linfocitos T, inhibiendo así la activación de los linfocitos T	2005 Artritis reumatoide
Rilonacept (Arcalyst®)	Dos cadenas, cada una compuesta por el extremo C-terminal de la región de unión al ligando de la proteína accesoria IL-1R fusionado al extremo N-terminal del ECD de IL-1RI, fusionado al Fc de la IgG1 humana	Se une a IL-1, impidiendo así la interacción con los receptores de la superficie celular endógenos	2008 Psoriasis en placa
Romiplostim (Nplate®)	Péptido mimético de trombopoyetina (TPO) fusionado al extremo C-terminal del Fc aglucosilado de la IgG1 humana, producido en <i>E. coli</i>	Se une y agoniza al receptor TPO; funcionalidad de Fc minimizada debido a la falta de glucosilación	2008 Trombocitopenia
Belatacept (Nulojix®)	ECD de CTLA-4 fusionado a Fc de la IgG1 humana; difiere de abatacept en dos sustituciones de aminoácidos (L104E, A29Y) en la región de CTLA-4	Bloquea las interacciones entre CD80 o CD86 en las APC y CD28 en los linfocitos T, inhibiendo así la activación de los linfocitos T	2011 Profilaxis del rechazo de órganos en pacientes adultos receptores de trasplante renal
Aflibercept (Eylea™)	Los ECD de los receptores de VEGF 1 y 2 fusionados a Fc de la IgG1 humana	Se une a todas las formas de VEGF-A, así como al factor de crecimiento placentario, inhibiendo así la angiogénesis	2011 Degeneración macular húmeda relacionada con la edad

En algunos aspectos de la divulgación, la fusión Fc progenitora y la fusión Fc de la divulgación pueden compartir secuencias similares o idénticas excepto por las modificaciones al dominio Fc como se da a conocer en este documento.

- 5 Las proteínas de fusión Fc también pueden contener sólo una variante del dominio CH2 en lugar de toda una región Fc. Las proteínas de fusión que contienen una variante del dominio CH2 se pueden usar, por ejemplo, como un dominio de dimerización y/o para dirigir el polipéptido de fusión a FCγIIIB. En un aspecto de la divulgación la pareja de fusión puede ser otro dominio Fc, como un dominio Fc de IgE, creando un polipéptido Fc en "tándem". Se demostró que un polipéptido de fusión IgG-IgE se une a FcεR y FcγRIIB y detiene la desgranulación de los mastocitos. Véase Cermerski et al., 2012, Immunol. Lett. 143:34-43

6.4. Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

- 15 La presente divulgación abarca moléculas de ácido nucleico y células huésped que codifican las variantes de los polipéptidos Fc de la divulgación.

Una variante de un anticuerpo de la divulgación que es un anticuerpo se puede preparar por expresión recombinante de los genes de las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina en una célula huésped. Por

ejemplo, para expresar un anticuerpo de manera recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina de modo que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula huésped y, opcionalmente, son secretadas en el medio en el cual se cultivan las células huésped, medio del cual se pueden recuperar los anticuerpos. Las metodologías estándar de recombinación del ADN se utilizan para obtener genes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, incorporar esos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en las células huésped, tales como los descritos en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la patente de EE.UU. N° 4,816,397.

En un aspecto de la divulgación, las variantes de los polipéptidos Fc pueden ser similares a sus equivalentes de tipo silvestre salvo por los cambios en sus dominios Fc. Para generar los ácidos nucleicos que codifican las variantes de los polipéptidos Fc, se puede sintetizar un fragmento de ADN que codifique el dominio Fc o una porción del dominio Fc del anticuerpo de tipo silvestre (que se conoce como el "dominio de Fc tipo silvestre") y utilizar como plantilla para la mutagénesis a fin de generar un polipéptido como el descrito en este documento mediante técnicas de mutagénesis de rutina; alternativamente, se puede sintetizar directamente un fragmento de ADN que codifique el polipéptido.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los dominios Fc de tipo silvestre, esos fragmentos de ADN se pueden manipular posteriormente mediante técnicas estándar de recombinación del ADN, por ejemplo, para convertir los genes de la región constante en genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica CH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, como una región variable de un anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", según se usa en este contexto, pretende dar a entender que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

Para expresar las variantes de los polipéptidos Fc de la divulgación, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o total, obtenidos según se describió precedentemente, se insertan en vectores de expresión de manera que los genes se unen operativamente a las secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "se unen operativamente" pretende dar a entender que un gen de un polipéptido está ligado en un vector tal que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen del polipéptido. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la expresión de la célula huésped utilizada. Un gen de cadena ligera de una variante de un anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más generalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes de los polipéptidos se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del polipéptido y el vector, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción de las secuencias de la variante del dominio Fc, el vector de expresión ya puede llevar secuencias de la región variable del anticuerpo. Además o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se una en marco al extremo amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no sea inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Esas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (como el promotor/potenciador de CMV), Simian Virus 40 (SV40) (como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y el polioma. Para obtener una descripción más detallada sobre los elementos reguladores virales y sus secuencias, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5,168,062 por Stinski, la patente de EE.UU. N° 4,510,245 por Bell et al., y la patente de EE.UU. N° 4,968,615 por Schaffner et al.

Además de los genes de cadenas de anticuerpos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que el vector ha sido introducido (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped con DHFR con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418). Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" están destinadas a abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Es posible expresar los polipéptidos de la divulgación en células huésped procarióticas o eucariotas. En ciertas realizaciones, la expresión de polipéptidos se realiza en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamífero, para la secreción óptima de un polipéptido adecuadamente plegado e inmunológicamente activo. Los ejemplos de células huésped de mamífero para la expresión de polipéptidos recombinante de la divulgación incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células DHFR⁻ CHO descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, células 293 y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de polipéptidos en células huésped de mamíferos, los polipéptidos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del polipéptido en las células huésped o la secreción del polipéptido en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas. Las células huésped también se pueden usar para producir porciones de polipéptidos intactas, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente divulgación.

La tecnología de recombinación del ADN también se puede usar para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no sea necesario para la unión al antígeno. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están comprendidas por los polipéptidos de la divulgación.

En algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos de la divulgación pueden ser anticuerpos bifuncionales. Dichos anticuerpos, en los que una cadena pesada y una ligera son específicas para un antígeno y las otras cadenas pesada y ligera son específicas para un segundo antígeno, se pueden producir mediante reticulación de un anticuerpo de la divulgación a un segundo anticuerpo mediante métodos estándar de reticulación química. Los anticuerpos bifuncionales también se pueden producir mediante la expresión de un ácido nucleico diseñado para codificar un anticuerpo bifuncional.

En ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos con doble especificidad, es decir, los anticuerpos que se unen a un antígeno y a un segundo antígeno no relacionado utilizando el mismo sitio de unión, se pueden producir mediante la mutación de residuos de aminoácidos en las CDR de las cadenas ligeras y/o pesadas. Los ejemplos de segundos antígenos incluyen una citocina proinflamatoria (como, por ejemplo, linfotóxina, interferón- γ o interleucina-1). Los polipéptidos con doble especificidad se pueden producir por ejemplo, mediante la mutación de residuos de aminoácidos en la periferia del sitio de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614). Los polipéptidos bifuncionales también se pueden producir mediante la expresión de un ácido nucleico diseñado para codificar un polipéptido de doble especificidad.

Los polipéptidos de la divulgación, también se pueden producir por síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill). Los polipéptidos también se pueden generar utilizando una plataforma exenta de células (véase, por ejemplo, Chu et al., Biochemia N° 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

Los métodos para la expresión recombinante de proteínas de fusión Fc se describen en Flanagan et al., Methods in Molecular Biology, vol. 378: Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols.

Una vez que se ha producido un polipéptido de la divulgación por expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en el área para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno después de la selección de la proteína A o la proteína G, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además,

los polipéptidos de la presente divulgación o fragmentos de los mismos se pueden fusionar a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en este documento o, de lo contrario, conocidas en el área para facilitar la purificación.

- 5 Una vez aislado un polipéptido, se puede si se desea, purificarlo aún más, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work y Burdon, eds., Elsevier, 1980)), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

10 6.5. Actividad biológica de las variantes de polipéptidos Fc

Debido a la incorporación de sustituciones de aminoácidos en la región Fc que afectan a la unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB, los polipéptidos de la divulgación muestran actividad biológica modificada, por ejemplo, función efectora y/o unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB modificadas.

- 15 En un aspecto de la divulgación, la función efectora puede ser ADCC. Por consiguiente, la divulgación proporciona una variante de un polipéptido Fc que se caracteriza por presentar ADCC está disminuida en al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70% o incluso más, en comparación con un polipéptido Fc no variante, es decir, un polipéptido que es idéntico, salvo por las sustituciones que aumentan la unión a FcγRIIB y/o disminuyen la unión a FcγRIIIA, por ejemplo, una o más de las sustituciones V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W.

- 20 En ciertos aspectos de la divulgación, la disminución en ADCC se puede medir en un ensayo *in vitro* a una concentración del polipéptido de 1 µg/mL o 2 µg/mL o más (por ejemplo, 3 µg/mL, 4 µg/mL o 5 µg/mL) usando una relación entre célula efectora y célula diana, por ejemplo, de 25:1, 40:1, 50:1 o 60:1, por ejemplo, cuando se usan células efectoras PBMC de 3 o más, 6 o más, 10 o más, o 50 o más donantes sanos. La actividad ADCC se puede medir por citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 9, o midiendo la liberación de ⁵¹Cromo, como se describe en el Ejemplo 10. La célula diana utilizada en un ensayo de ADCC dependerá de la especificidad de unión de la variante del polipéptido, y puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 9, las células Raji son células diana adecuadas para analizar la actividad ADCC del anticuerpo Hu1D10 (y sus variantes de Fc) y, como se describe en el Ejemplo 10, las células RL de linfoma son células diana adecuadas para ensayar la actividad ADCC de un anticuerpo anti-CD40 (y sus variantes de Fc).

- 25 En otro aspecto de la divulgación, la función efectora puede ser la activación inmunitaria de una célula diana por un polipéptido Fc de reticulación. Por ejemplo, en un ensayo, la célula diana es una célula dendrítica y el polipéptido Fc de reticulación es un anticuerpo anti-CD40. Normalmente, la unión de una región Fc a FcγRIIB proporciona una señal negativa a las células positivas para FcγRIIB a través del motivo ITAM del receptor. Sin embargo, la unión de una región Fc de un anticuerpo anti-CD40 a FcγRIIB en la superficie de las células dendríticas mejora la reticulación de CD40, dando como resultado un aumento de la producción de IL-12 por las células dendríticas. El aumento de la afinidad por FcγRIIB por lo tanto, resulta en una mayor secreción de IL-12. Por consiguiente, la divulgación proporciona una variante de un polipéptido Fc cuya región Fc aumenta la secreción de IL-12 en las células dendríticas cuando se injerta en un anticuerpo CD40. En varios aspectos de la divulgación la región Fc puede activar las células dendríticas en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, o incluso más, en comparación con un anticuerpo anti-CD40 no variante, es decir, un anticuerpo anti-CD40 que es idéntico, salvo por las sustituciones que aumentan la unión a FcγRIIB y opcionalmente también disminuyen la unión a FcγRIIIA, por ejemplo, una o más de las sustituciones V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W

- 30 En ciertos aspectos de la divulgación, la activación inmunitaria de células dendríticas se puede medir en un ensayo de secreción de IL-12p70. En resumen, las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos ("moDC") pueden ser estimuladas con un polipéptido de la divulgación y cebadas con IFN γ , y la cantidad resultante de IL-12p70 producida, se puede analizar, por ejemplo, mediante ELISA. En un aspecto ejemplar de la divulgación, el ensayo de secreción de IL-12p70 se puede realizar como se describe en el ejemplo 11 a continuación.

- 35 En otros aspectos de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede mostrar una mayor unión a FcγRIIB y/o una menor unión a FcγRIIIA. Los ejemplos de ensayos de unión se describen en los ejemplos 7 y 8. En ciertos aspectos de la divulgación, la unión de una variante de un polipéptido a FcγRIIB puede ser de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50% mayor que la unión a FcγRIIB de un polipéptido Fc no variante, por ejemplo, un polipéptido que es idéntico, salvo por la una o más de las sustituciones de V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W. En otros aspectos de la divulgación, la unión de una variante de un polipéptido a FcγRIIIA puede ser de al menos aproximadamente 10%, al menos

aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50% menor que la unión a FcγRIIIA de un polipéptido Fc no variante, por ejemplo, un polipéptido que es idéntico salvo por la una o más de las sustituciones de V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K y V305W.

5

6.6. Conjugados de polipéptidos

Los polipéptidos de la divulgación incluyen conjugados de polipéptidos que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido, de modo que la unión covalente no interfiera con la unión al antígeno.

10

En ciertos aspectos, un polipéptido de la divulgación se puede conjugar a una molécula efectora o a un marcador. La expresión "molécula efectora" según se usa en este documento incluye, por ejemplo, antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros de origen natural o sintéticos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados por NMR o espectroscopia ESR.

15

En un ejemplo, los polipéptidos se pueden conjugar a una molécula efectora, como un agente citotóxico, un radionúclido o una molécula de fármaco para modificar una determinada respuesta biológica. La molécula efectora puede ser una proteína o un polipéptido, como, por ejemplo, y no exclusivamente, una toxina (como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica), una molécula de señalización (como el interferón α, el interferón β, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el activador del plasminógeno tisular), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica como una citocina o un factor de crecimiento (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor de crecimiento nervioso (NGF)).

20

En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos. Los ejemplos de citotoxinas y agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos.

30

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no exclusivamente, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C5 y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ej., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

35

40

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos como, pero no exclusivamente, ^{111}In e ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 y fármacos como, pero no exclusivamente, alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

45

Las técnicas para conjugar esas moléculas efectoras a polipéptidos son bien conocidas en el área (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., en las pp. 623-53 (Robinson et al., eds., 1987); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

50

En un ejemplo, el polipéptido se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), a través del extremo N-terminal o el extremo C-terminal del polipéptido o internamente, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma; por ejemplo, al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). El polipéptido se puede unir a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio Fc del polipéptido. Se pueden crear procedimientos de recombinación del ADN para crear dichas fusiones, por ejemplo, como se describe en WO 86/01533 y EP0392745. En otro ejemplo la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o mejorar el suministro de un polipéptido al sistema inmunitario a través de una barrera epitelial. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina como los descritos en WO 2005/117984.

55

60

En ciertos aspectos, un polipéptido se conjuga a una toxina de molécula pequeña. En ciertas realizaciones ejemplares, un polipéptido de la divulgación se conjuga a una dolastatina o con análogos peptídicos o derivados de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (patentes de EE.UU. N° 5,635,483 y 5,780,588). La molécula de fármaco dolastatina o auristatina puede estar unida al polipéptido mediante su extremo N (amino)-terminal, C (carboxilo)-

terminal o internamente (WO 02/088172). Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen el extremo N-terminal unido a moléculas del fármaco monometilauristatina DE y DF, como se da a conocer en la patente de EE.UU. N° 7,498,298 (que da a conocer, por ejemplo, conectores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina como MMAE y MMAF conjugados a conectores).

En otras realizaciones ejemplares, las toxinas de molécula pequeña incluyen pero no exclusivamente, caliqueamicina, maitansina (patente de EE.UU. N° 5,208,020), tricoteno y CC1065. En una realización de la divulgación, el polipéptido se conjuga a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, de 1 a 10 moléculas de maitansina por molécula de polipéptido). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me, que se puede reducir a a May-SH3 y hacer reaccionar con un polipéptido (Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131) para generar un conjugado maitansinoide-polipéptido o maitansinoide-fusión Fc. Se pueden usar también análogos estructurales de caliqueamicina incluidos, pero no exclusivamente, γ_1^1 , γ_3^1 , γ_3^1 N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 , (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928; patente de Estados Unidos N° 5,714,586; patente de Estados Unidos N° 5,712,374; patente de Estados Unidos N° 5,264,586; patente de Estados Unidos N° 5,773,001).

Los polipéptidos de la divulgación también se pueden conjugar a liposomas para suministro dirigido (véase, por ejemplo, Park et al., 1997, Adv. Pharmacol. 40:399-435; Marty & Schwendener, 2004, Methods in Molecular Medicine 109:389-401).

En un ejemplo los polipéptidos de la presente divulgación se pueden unir a moléculas de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el polipéptido es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional terminal del aminoácido ubicado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Esos aminoácidos se pueden producir naturalmente en el fragmento del anticuerpo o se pueden diseñar en el fragmento utilizando métodos de recombinación del ADN. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5,219,996. Se pueden usar muchos sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Preferentemente las moléculas de PEG se pueden unir covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento del anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden utilizar moléculas efectoras apropiadamente activadas (por ejemplo, derivados selectivos de tiol como maleimidias y derivados de cisteína).

La palabra "marcador" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición detectable que se puede conjugar directa o indirectamente a un polipéptido de la divulgación. El marcador puede ser detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un sustrato, un compuesto o una composición, que sea detectable. Las moléculas fluorescente útiles incluyen, pero no exclusivamente, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Los marcadores enzimáticos útiles incluyen, pero no exclusivamente, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa y similares.

6.7. Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos

Debido a su baja actividad ADCC, los polipéptidos de la divulgación son particularmente útiles en el contexto de enfermedades y trastornos inmunitarios, incluidas las enfermedades autoinmunitarias, en las que la muerte celular puede no ser deseable. Los ejemplos de dichas enfermedades y dichos trastornos incluyen la enfermedad de Addison, las enfermedades autoinmunitarias del oído, las enfermedades autoinmunitarias del ojo, como la uveítis, la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad de Crohn, la diabetes (tipo I), la epididimitis, la glomerulonefritis, la enfermedad de Graves, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Hashimoto, la anemia hemolítica, el lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerosis múltiple, la miastenia gravis, el pénfigo vulgar, la psoriasis, la artritis reumatoide, la sarcoidosis, la esclerodermia, la psoriasis, el síndrome de Sjögren, las espondiloartropatías, la tiroiditis, la colitis ulcerosa y/o la vasculitis. Sin embargo, los polipéptidos de la divulgación también se pueden usar para tratar las indicaciones en las que la destrucción celular es deseable, por ejemplo, indicaciones oncológicas, especialmente cuando el polipéptido es capaz de señalización a través de la molécula diana y/o cuando se conjuga a una molécula efectora. La indicación o indicaciones específicas que son adecuadas para el tratamiento con una variante de un polipéptido Fc dependerán de la secuencia y/o las propiedades del polipéptido Fc o de la porción del polipéptido Fc no variante, y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la materia.

En un aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-CD40 y se usa para tratar un cáncer que expresa CD40, como leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T, linfoma no hodgkiniano, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom, sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas o cáncer renal. El anticuerpo anti-CD40 puede ser un anticuerpo multiespecífico.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-

CD20 y se usa para tratar la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-CD25 y se usa para tratar la esclerosis múltiple, la psoriasis, el asma, la uveítis, la inflamación ocular o la leucemia de linfocitos T humanos asociada al virus linfotrópico T humano tipo 1, o para prevenir el rechazo del trasplante de órganos.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-TNF α y se usa para tratar la artritis reumatoide, la artritis idiopática juvenil, la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o la psoriasis en placa.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-receptor de IL-6 y se usa para tratar la artritis reumatoide o la enfermedad de Castleman.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-integrina- $\alpha 4$ y se usa para tratar la esclerosis múltiple.

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-IL-1 y se usa para tratar los Síndromes Periódicos Asociados a Criopirina ("CAPS").

En otro aspecto de la divulgación, una variante de un polipéptido de la divulgación puede ser un anticuerpo anti-BAFF y se usa para tratar el lupus eritematoso sistémico o la alergia.

La divulgación proporciona métodos para tratar cualquiera de las enfermedades precedentes en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar al paciente un polipéptido apropiado de la divulgación en una dosis terapéuticamente eficaz.

Según se usa en este documento, se puede administrar una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un polipéptido como una dosis única o durante el transcurso de un régimen terapéutico, por ejemplo, en el transcurso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año o más.

La dosis de un polipéptido de la divulgación a ser administrada variará de acuerdo con la especificidad antigénica particular, el tipo de enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se usa un agente terapéutico de combinación) y la vía de administración elegida; la dosis apropiada puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia.

Para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias en humanos y animales, las composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos se pueden administrar a los pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) en dosis terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, dosis que resultan en la inhibición de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria y/o el alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria) utilizando cualquier vía de administración adecuada, como la inyección y otras vías de administración conocidas en el área para productos clínicos basados en anticuerpos.

Será evidente para cualquier experto en la materia que la cantidad óptima y el espaciamiento entre dosis individuales de un polipéptido de la divulgación serán determinados por la naturaleza y la entidad de la enfermedad en tratamiento, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y condición del sujeto particular que se esté tratando, y en última instancia un médico determinará las dosis adecuadas a utilizar. Estas dosis se pueden repetir tantas veces como sea apropiado. Si aparecen efectos secundarios, se pueden alterar o reducir la cantidad y/o la frecuencia de las dosis, de conformidad con la práctica clínica habitual.

De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento de una enfermedad abarca el tratamiento de pacientes ya diagnosticados con cualquier forma de la enfermedad, en cualquier etapa clínica o manifestación; el retraso de la aparición o la evolución o el agravamiento o el deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o la prevención y/o la atenuación de la gravedad de la enfermedad.

Un "sujeto" o "paciente" a quien se administra el polipéptido de la divulgación es preferentemente un mamífero como un no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, mono o humano). En ciertos aspectos de la divulgación, el sujeto o paciente puede ser un humano. En ciertos aspectos, el humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el ser humano es un paciente adulto.

En este documento se proporcionan composiciones que contienen un polipéptido de la divulgación. Las composiciones se suministrarán generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que

normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un paciente).

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un polipéptido de la divulgación por dosis. Una unidad de ese tipo puede contener por ejemplo, pero no exclusivamente, de 5 mg a 5 g, por ejemplo de 10 mg a 1 g, o de 20 a 50 mg, de 40 mg a 100 mg o de 50 mg a 300 mg. Los portadores farmacéuticamente aceptables para utilizar en la divulgación pueden tomar una amplia variedad de formas, dependiendo, por ejemplo, de la afección a tratar o de la vía de administración.

Las formulaciones terapéuticas de los polipéptidos de la divulgación se pueden preparar para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas, mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales, empleados habitualmente en el área (todos indicados aquí como "portadores"), es decir, tampones, estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos diversos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol ed., 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los destinatarios en las dosis y concentraciones empleadas.

Los tampones ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en concentraciones que van desde aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los tampones adecuados para utilizar con la presente divulgación incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sus sales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampones de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Además, se pueden utilizar tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina como Tris.

Se pueden añadir conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y se pueden agregar en cantidades que oscilan entre el 0.2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para utilizar con la presente divulgación incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquil parabenos como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden agregar isotonicantes a veces conocidos como "estabilizantes" para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente divulgación e incluyen alcoholes polihídricos de azúcar por ejemplo alcoholes trihidricos o alcoholes de azúcar superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en su función desde un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes polihídricos de azúcar (enumerados previamente); aminoácidos como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, como lactosa, trehalosa, estaquirosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluidos ciclitoles como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; reductores que contienen azufre, como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como monosacáridos de polivinilpirrolidona, como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos como rafinosa; y polisacáridos como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0.1 a 10 000 partes en peso por parte en peso de proteína activa.

Se pueden agregar surfactantes o detergentes no iónicos (también conocidos como "humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que también permite que la formulación se exponga a superficie de cizallamiento tensada sin causar desnaturalización de la proteína. Los surfactantes no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietileno sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los surfactantes no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 1.0 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0.07 mg/l a aproximadamente 0.2 mg/ml.

Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y cosolventes. Otras formulaciones adecuadas para los polipéptidos de la divulgación se dan a conocer en la solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0033228 A1.

7. Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de una colección de CH2 punto por punto (PxP)

Hu1D10, un anticuerpo monoclonal específico para la cadena beta de HLA-DR (Shi et al., 2002 Leuk Lymphoma. 43(6):1303-12) se usó como un sistema modelo. Los dominios VL y VH sintéticos para Hu1D10 fueron construidos por un proveedor de síntesis de genes comercial (DNA 2.0 Inc., Menlo Park, CA) y se clonaron en el vector pYA206 para crear el plásmido pYA206-Hu1D10. El vector pYA206 es un vector episómico derivado del virus de Epstein-Barr diseñado para la expresión y presentación de anticuerpos en la superficie de células de mamíferos.

Se escogieron 84 posiciones de aminoácidos en el dominio 2 (CH2) de la región constante de la cadena pesada como dianas para mutagénesis utilizando un método de aleatorización NNK. Se utilizó el esquema de codificación NNK (en el que N = A, C, G o T y K = G o T) porque 1) sólo se requieren 32 codones para codificar los 20 aminoácidos naturales, 2) sólo se incluye un único codón de parada (TAG) en los 32, y 3) la degeneración máxima (número de codones diferentes que codifican un solo aminoácido) es 3, en lugar de la degeneración máxima de 6 veces que ocurre en el código genético completo de 64 codones.

Ochenta y cuatro fragmentos de ADN diferentes que codifican el isotipo Fc γ humano (Fc γ), cada uno con degeneración NNK en una posición CH2 diferente, fueron sintetizados por un proveedor comercial de genes sintéticos (DNA 2.0, Menlo Park, CA). Los genes Fc γ sintéticos se digirieron con enzimas de restricción Sall y NotI y se subclonaron en el plásmido pYA206-hu1D10. Las ligaduras se transformaron en células de *E. coli* Top10 (Invitrogen, CA) de modo que al menos se obtuvieran 10 veces más de transformantes de *E. coli* que el número total de posibles codones de esa sub-colección. La colección de CH2 resultante estuvo compuesta por 1680 codones diferentes totales en 84 posiciones distintas.

Ejemplo 2: Determinación de la unión de Fc γ RIIB

Se llevó a cabo una titulación con clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar la unión de Fc γ RIIB a Fc γ de control sin modificar. Debido a la interacción de baja afinidad entre Fc γ RIIB y Fc γ , se utilizó un complejo 8:4:1 para la citometría de flujo (FIGURA 3): se preincubaron cinco microgramos de Fc γ RIIB (R&D Systems, 1875-CD) con 12.5 μ g de anti-poli-histidina biotinilada (R&D Systems, BAM050), luego se agregaron a 3.5 μ g de Estreptavidina-APC (Southern Biotech, N° de cat. 7100-11L). Después este complejo se diluyó en serie 4 veces y se combinó con kappa-PE antihumano de cabra (Southern Biotech, 2060-09). Para determinar la EC₅₀ de la unión de Fc γ R-complejo, se agregaron 100 μ l de complejo a 2×10^5 células en cada concentración y se incubaron durante 1 hora. Después de tres lavados en un tampón de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences). Se determinó el porcentaje de células en el cuadrante doble positivo y se graficó en función de la concentración de Fc γ RIIB. Se determinó que la EC₅₀ era de 3.6 μ g/mL (FIGURA 4A).

Ejemplo 3: Determinación de la unión de Fc γ RIIA

Se llevó a cabo una titulación FACS para evaluar la unión de Fc γ RIIA a Fc γ . Debido a la interacción de baja afinidad entre Fc γ RIIA y Fc γ , se utilizó un complejo 2:1:1 para la citometría de flujo (FIGURA 3). Se preincubaron 9 μ g de Fc γ RIIA (R&D Systems, N° de cat. 4325-Fc) con 15 μ g de anti-poli-histidina biotinilada (R&D Systems, BAM050), luego se agregaron a 15 μ g de Estreptavidina-APC (Southern Biotech, N° de cat. 7100-11L). Después este complejo se diluyó en serie 4 veces y se combinó con kappa-PE antihumano de cabra (Southern Biotech, 2060-09). Para determinar la EC₅₀ de la unión de Fc γ R-complejo, se agregaron 100 μ l de complejo a 2×10^5 células en cada concentración y se incubaron durante 1 hora. Después de tres lavados en un tampón de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences). Se determinó el porcentaje de células en el cuadrante doble positivo y se graficó en función de la concentración de Fc γ RIIA. Se determinó que la EC₅₀ era de 0.17 μ g/mL (Fig. 2B).

Ejemplo 4: Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de la colección de CH2

Se transfeció la colección de CH2 en células 293c18 con 0.5 μ g de plásmidos de la colección, 100 μ g de plásmido portador pACYC184 y 250 μ l de lipofectamina; se seleccionó utilizando 0.8 μ g/ml de puromicina después de 2 días, y se cultivó por otros 18 días antes de la clasificación FACS.

Las células se tiñeron de forma conjunta con anticuerpo Kappa-PE antihumano marcado con PE 1:200 (Southern

Biotech) y con FcγRIIIA-complejo o FcγRIIB-complejo (FIGURA 3) al, o por debajo del, 50% de unión máxima según se determinó mediante titulación. Se clasificaron un mínimo de 1×10^5 células de tres poblaciones: alta (H), media (M) y baja (L), según la unión diferencial a FcγR. Un resultado de clasificación FACS representativo se muestra en la FIGURA 5. Las variantes con las propiedades deseadas se enriquecieron en la puerta H en la unión a FcγRIIB y se enriquecieron en la puerta L en la unión a FcγRIIIA.

Ejemplo 5: Secuenciación masivamente paralela de las poblaciones "expresadas" y "clasificadas"

Se recuperaron los plásmidos de las poblaciones de células H, M y L clasificadas como se describe en el Ejemplo 4, y se realizó una amplificación por PCR para preparar amplicones cortos adecuados para la secuenciación masivamente paralela. Luego se secuenciaron los amplicones utilizando el Genome Sequencer FLX según las indicaciones del fabricante (454 Life Sciences, Branford, CT). Se determinaron aproximadamente 800 000 secuencias individuales para cada población de células clasificadas por FACS.

Se examinaron las secuencias y se tabuló el número de veces que se encontró cada mutación puntual en la población "expresada" y "clasificada". Cada codón de aminoácido fue inicialmente identificado y tabulado. Para los aminoácidos con más de un codón, se sumó la aparición de los diferentes codones para cada aminoácido para hacer un resumen general del comportamiento de esa variante del aminoácido en cada subpoblación. Para la clasificación de 3 vías de la colección de CH2 para evaluar la unión a FcγRIIIA o FcγRIIB, se asignó una puntuación de Relación de Enriquecimiento (ER) para cada variante del codón. La ER indica cuánto más o menos frecuentemente se encuentra la variante en la población H en comparación con su frecuencia general. De manera similar, las relaciones de enriquecimiento se pueden calcular para cada variante en cada una de las poblaciones M y L. Se espera mayor enriquecimiento en las variantes de mayor afinidad se enriquezcan en la población H ($ER > 1$) y que se agoten ($ER < 1$) en la población L. A la inversa, se espera que los mutantes de menor afinidad se agoten en la población H ($ER < 1$) y haya mayor enriquecimiento de ellos en la población L ($ER > 1$). Es posible identificar variantes de afinidad superior, inferior y neutra simplemente observando las relaciones de enriquecimiento para la población H.

Ejemplo 6: Identificación de mutantes puntuales con propiedades deseadas

La mutagénesis integral de 84 posiciones en CH2 identificó variantes con una unión significativamente mayor a FcγRIIB y una unión significativamente menor a FcγRIIIA (menor que WT), cuadrante inferior derecho en la FIGURA 6. En este ejemplo, se consideró que 2 desviaciones estándar por encima del promedio del tipo silvestre era significativamente mayor, y por debajo del promedio de tipo silvestre era significativamente menor.

En la FIGURA 7 se muestran las posiciones y sustituciones que se identificaron como que tenían una unión a FcγRIIB significativamente mayor y una unión significativamente menor a FcγRIIIA. Las variantes de la IgG humana se expresaron con el dominio de unión Hu1D10 como IgG1 soluble o se expresaron en la superficie en células 293c18.

Ejemplo 7: Confirmación de mayor unión empleando FACS de un solo punto (un punto)

Para confirmar la mayor unión a FcγRIIB, se realizó un análisis de FACS de un punto comparando las variantes con la IgG progenitora expresada en células 293c18. Se tiñeron las células 293c18 que expresan la variante de IgG y los controles con complejo de FcγRIIB a la concentración de EC_{50} . Las células 293c18 que expresan una variante de Fc que contiene la modificación N297A se usaron como control negativo. S267E, L328F y el mutante doble "SELF" se incluyeron como controles positivos. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un dispositivo FACSCalibur y se graficó el resultado para cada variante en función del tipo silvestre, con la unión de FcγR en el eje y y la expresión de IgG en el eje x (FIGURA 8).

Para confirmar la disminución de la unión a FcγRIIIA, se realizó un análisis de FACS de un punto comparando las variantes con la IgG progenitora expresada en células 293c18. Se tiñeron las células 293c18 que expresan la variante de IgG y los controles con complejo de FcγRIIIA a la concentración de EC_{50} . Se utilizaron las 293c18 que expresan N297A, S267E, L328F, y el mutante doble "SELF" como controles. Las muestras se analizaron por citometría de flujo utilizando un dispositivo FACSCalibur y el resultado para cada variante se graficó frente al tipo silvestre (WT), con la unión a FcγR en el eje y, y la expresión de IgG en el eje x (FIGURA 9). Las variantes con el cambio descendente más significativo resultaron ser V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y.

Ejemplo 8: Unión de variantes a células que expresan FcγR

Las variantes de los anticuerpos Hu1D10 IgG se expresaron en forma soluble, se purificaron y luego se usaron para evaluar la unión a células CHO que expresan FcγRIIB. Las variantes de IgG se diluyeron en serie 3 veces, comenzando a $20 \mu\text{g/ml}$ o 133 nM , luego se agregaron a 2×10^5 células/prueba. Se usó anticuerpo kappa antihumano para detectar la unión de la variante de IgG. Las muestras se analizaron en un FACSCalibur y se gráfico

la fluorescencia en función de la concentración de IgG. La FIGURA 10 confirma que todas las variantes tienen una mayor unión máxima a FcγRIIB que el anticuerpo de tipo silvestre.

Las variantes de Hu1D10 IgG se purificaron y se usaron para evaluar la unión a transfectantes FcγRIIIA CHO. Las variantes de IgG se diluyeron en serie 3 veces, comenzando a 20 µg/mL o 133 nM y después se agregaron a 2×10^5 células/prueba. Se usó una tinción secundaria de anticuerpo kappa antihumano para detectar la unión de la variante de IgG. Las muestras se analizaron en un FACSCalibur y se gráfico la fluorescencia en función de la concentración de IgG en la FIGURA 11. Todas las variantes se unieron de manera equivalente o menos bien a FcγRIIIA que el anticuerpo que contiene Fc de tipo silvestre.

Ejemplo 9: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos basada en FACS

Se optimizó un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos no radiactivo (ADCC) y se usó para analizar la variante de Hu1D10 IgG. Se usaron células Raji y PBMC purificadas de sangre entera recién extraída como células diana y efectoras, respectivamente, en una proporción de 1:40.

Las células Raji se lavaron y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10^6 células/ml, después se incubaron con una dilución 1:2000 de CSFE (Cell Technology, Inc., part 4002) durante 30 minutos. Las células Raji cargadas en CFSE se lavaron y se resuspendieron a una concentración de 4×10^5 /mL en medio de cultivo que consistía en RPMI + 10% de FBS inactivado por calor. Se añadieron 50 µl de suspensión celular a cada pocillo de una placa con fondo en V. Se agregaron 50 µL de variantes de IgG diluir idas en serie 3 veces a cada pocillo, comenzando a 18 µg/ml.

Las PBMC se purificaron de sangre heparinizada recién extraída y se centrifugaron en Ficoll-Paque (GE, 17-1440-02) a 665 RCF durante 30 minutos. La capa de PBMC se recogió y se lavó tres veces con PBS + 10% de SFB, primer lavado a 1350 RCF durante 15 minutos, segundo lavado a 225 RCF durante 10 minutos, y el tercer lavado a 225 RCF durante 10 minutos. Después del lavado final, las células se resuspendieron en medios de cultivo y se contaron usando un Vi-Cell Rx. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 8×10^6 células/ml en medios de cultivo. Se añadieron 100 µl de suspensión celular a cada pocillo de la suspensión de diana/IgG y se incubaron a 37 °C durante cuatro horas. Las suspensiones celulares se tiñeron con dilución 1:5 de 7AAD (BD Biosciences, número de catálogo 559925) y se incubaron durante 30 minutos. Para determinar la muerte espontánea de las células diana, las células Raji cargadas en CSFE se incubaron sólo con medio (0 mg/ml de IgG, sin PBMC) y luego se tiñeron con 7AAD. Las muestras se analizaron en un FACSCalibur.

Se graficaron los datos de FACS para cada muestra con CFSE (FL1) en el eje x y 7AAD (FL3) en el eje y. Se dibujó un cuadrante, que discriminaba las células diana (CFSE+) de las PBMC (CFSE-), así como de las células 7AAD-positivas de las 7AAD-negativas (FIGURA 12). El número de células en el cuadrante superior derecho se definió como "muertas" y las del cuadrante inferior derecho como "vivas". Se calculó el porcentaje de citotoxicidad, restando la muerte espontánea. Se gráfico el porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de IgG para determinar la EC₅₀ (FIGURA 13A).

Las variantes Hu1D10 se agruparon en función de la actividad ADCC. La FIGURA 13B muestra mutantes ascendentes de FcγRIIB que tienen alguna actividad ADCC, aunque más baja que la del tipo silvestre; La FIGURA 13C muestra variantes con poca o ninguna actividad ADCC. La FIGURA 13D compara las variantes hu1D10 que no tienen ADCC con las sustituciones que resultan en una disminución de la unión a FcγRIIIA (S267E, L328F, doble mutante "SELF") de acuerdo con la bibliografía. La FIGURA 14D muestra que V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y provocaron respuestas de ADCC comparables a la de L328F y respuestas inferiores a las de S267E y SELF.

Ejemplo 10: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de variantes de unión a Fc de un mAb anti-CD40

Se diseñó un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de acuerdo con un protocolo estándar (Law et al., 2005, Cancer Res. 65:8331-8) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD40 con modificaciones en Fcγ. Las células RL de linfoma se marcaron con ⁵¹Cromio durante 1 hora como células diana. Se utilizaron PBMC como células efectoras y se mezclaron con las dianas en una proporción de 50:1. Se diluyó en serie anti-CD40 y se aplicó a mezclas de células diana/efectoras. Después de 4 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO₂, se recogieron 100 µl del sobrenadante del cultivo y se monitoreó la radioactividad liberada con un contador gamma. Los cultivos sin anticuerpo se registraron como controles negativos tratados con medios, y la liberación máxima de ⁵¹Cromo se logró mediante el tratamiento con Triton X100 de las células diana marcadas. El porcentaje final de citotoxicidad se calculó utilizando la fórmula: $((\text{muestra} - (\text{diana} + \text{medios})) / ((\text{diana} + \text{Triton}) - (\text{diana} + \text{medios}))) * 100$. Las variantes de Fcγ V263L, V273E, V273F, V273M, V273S y V273Y no indujeron actividad ADCC (FIGURA 14).

Ejemplo 11: Actividad funcional de mAb anti-CD40 con sustituciones Fcγ

Para probar si la unión diferencial a FcγRIIB afecta la activación inmunitaria de las células dendríticas, se construyeron anticuerpos monoclonales anti-CD40 con las sustituciones en Fcγ y se probaron en un ensayo de secreción de IL-12p70.

5 Se añadió sangre entera de donantes humanos sanos, diluida con un volumen igual de PBS, a un tubo Leucosep (Greiner Bio One), que contenía Ficoll-Paque Plus por debajo de la frita (15 ml). Después la sangre se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos sin freno. Se recogieron las PBMC y se lavaron una vez con PBS, se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron una vez con RPMI 1640. Las células se resuspendieron en medio de cultivo SN12C (RPMI1640 + 10% de FBS inactivado por calor).

15 Generación de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos (moDC): los monocitos se aislaron de las PBMC con un kit de enriquecimiento de StemCell y se cultivaron en medio StemSep sin suero complementado con 10 ng/ml de GM-CSF y 20 ng/ml de IL-4, a 37 °C y 5% de CO₂, durante 6 días. Se agregaron al cultivo GM-CSF recién preparado e IL-4 el día 3 para ayudar a mantener la diferenciación de DC. Después de 6 días de cultivo, las CD inmaduras derivadas de monocitos se sometieron a análisis FACS para verificar el fenotipo de DC inmadura: Lin⁻, CD80/CD86+, HLA-DR+, CD11C+.

20 Monitoreo de la actividad agonista de anti-CD40 en la estimulación de IL-12p70 de moDC: se estimularon las moDC inmaduras con anti-CD40 y se cebaron con IFNγ durante 48 horas en medio StemSep sin suero complementado con GM-CSF e IL-4. El sobrenadante del cultivo se recogió y se analizó para determinar la producción de IL-12p70 mediante un kit de ELISA comercial. La FIGURA 15 muestra la producción de IL-12p70 de variantes inductoras de ADCC (FIGURA 15A) y no inductoras de ADCC (FIGURA 15B). De las variantes que no inducen ADCC, V273F y V273Y mostraron la mayor activación de células dendríticas, medida por la secreción de IL-12p70 (FIGURA 15C).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.
- <120> VARIANTES DE FC
- <130> 381493-884OT (125234)
- 35 <140>
- <141>
- <150> 61/791,624
- 40 <151> 2013-03-15
- <160> 38
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 50 <400> 1

ES 2 699 599 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

5 <210> 2
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 699 599 T3

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

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

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

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

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 3

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

Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
100 105 110

15

<210> 4
<211> 114
<212> PRT

ES 2 699 599 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Met Val Lys Gln Ser Lys Gly His Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

10

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 5

<211> 106

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

ES 2 699 599 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 6

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

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 7
<211> 106

ES 2 699 599 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

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

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

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

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

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

10 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

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

15 <210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

ES 2 699 599 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100

<210> 10
<211> 117

ES 2 699 599 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10 Ser Arg Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11

ES 2 699 599 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

15

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 108

ES 2 699 599 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13

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

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

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Met Leu Met
35 40 45

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

Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
85 90 95

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

<210> 14
<211> 117
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

ES 2 699 599 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Glu His Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 15

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

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

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

15

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

ES 2 699 599 T3

5 <210> 16
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

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

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

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 17
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 17

ES 2 699 599 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
100

<210> 18
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr
115

15

<210> 19
<211> 123

ES 2 699 599 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

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

10

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 20

ES 2 699 599 T3

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Glu Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Gly Thr Ala Ser
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 21

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

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

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

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

10

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

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

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

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>

ES 2 699 599 T3

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

5
<400> 22
Ala Asp Ala Ala Pro
1 5
<210> 23
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

15
<400> 23
Thr Val Ala Ala Pro
1 5
20 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

30
<400> 24
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
1 5 10
35 <210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 25
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10
45 <210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

55
<400> 26
Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5
60 <210> 27
<211> 13
<212> PRT

Ala Lys Thr Thr Ala Pro
 1 5
 5
 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 32
Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 1 5
 15
 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 33
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 1 5 10
 30
 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 40 <400> 34
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 1 5 10
 45
 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 35
Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5
 55
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 599 T3

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 36
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

10 <210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 37

20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

25 <210> 38
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
<400> 38

ES 2 699 599 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 699 599 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo que contiene un dominio CH2 de SEC. ID N°: 2, que tiene en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2
- (a) una sustitución o conjunto de sustituciones según el índice EU de Kabat elegidas entre:
- 10 (i) V273E,
(ii) V273F,
(iii) V273M,
(iv) V273S,
(v) V273Y,
15 (vi) V263L y V273E,
(vii) V263L y V273F,
(viii) V263L y V273M,
(ix) V263L y V273S, y
(x) V263L y V273Y;
- 20 (b) la sustitución V263L según el índice EU de Kabat, donde el anticuerpo se une específicamente a CD40;
o
(c) la sustitución V263L según el índice EU de Kabat, donde el anticuerpo se une específicamente a una molécula coestimuladora elegida entre CD28, PD-1, CTLA-4, CD80, CD86, TIM3, OX40, 4-1BB, GITR, CD27, B7-H4 y DC-SIGN.
- 25 opcionalmente donde el dominio CH2 es parte de un dominio Fc que contiene T250Q y M428L según el el índice EU de Kabat.
- 30 **2.** El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo en (a) se une específicamente a CD40, CD25, CD3, una molécula de HLA, una molécula coestimuladora, una citocina, una quimiocina, una molécula de adhesión, un marcador de activación, o una proteína inmunomoduladora.
- 3.** Un compuesto conjugado que contiene el anticuerpo de la reivindicación 1 unido a una molécula efectora o a un marcador detectable.
- 35 **4.** Una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable, o el compuesto conjugado de la reivindicación 3.
- 5.** Un vector que contiene un ácido nucleico compuesto por una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 40 **6.** Una célula huésped procariota que contiene el vector de la reivindicación 5.
- 7.** Un método de producción de un anticuerpo, que comprende: (a) cultivar una célula huésped eucariota diseñada para expresar un ácido nucléico compuesto por una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1 y (b) recuperar el anticuerpo.
- 45 **8.** Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, un compuesto conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de un trastorno inmunitario o un cáncer en un paciente que lo necesita.
- 50 **9.** El anticuerpo, la composición farmacéutica, o el compuesto conjugado para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD40 y donde el cáncer es un cáncer hematológico, elegido opcionalmente entre leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T, linfoma no hodgkiniano, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom, sarcoma de Kaposi o un cáncer de tumor sólido, opcionalmente elegido entre cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer renal.
- 55 **10.** El anticuerpo de la reivindicación 2, donde la molécula coestimuladora es CD28, PD-1, CTLA-4, CD80, CD86, TIM3, OX40, 4-1BB, GITR, CD27, B7-H4 o DC-SIGN.
- 60 **11.** El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 12.** El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11 o 12, donde el anticuerpo es humanizado.

14. El anticuerpo de la reivindicación 13, donde el anticuerpo se une específicamente a CD40.

5 **15.** El anticuerpo de la reivindicación 14, donde el anticuerpo tiene en relación con el dominio CH2 de SEC. ID N°: 2 la sustitución V273E.

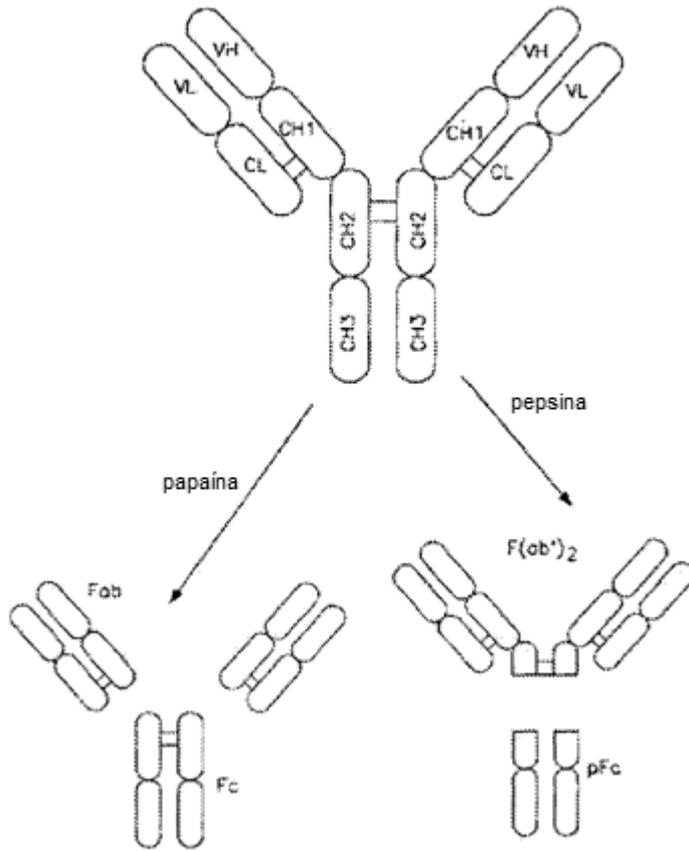


FIGURA 1

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD^{*}

[†] [‡] [#]
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK

FIGURA 2A

CH1

118 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
138 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
158 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
178 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
198 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V

Bisagra

216 E P K S C D K T H T C P P C P

CH2

231 A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
251 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
271 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
291 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
311 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
331 P I E K T I S K A K

CH3

341 G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
361 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
381 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
401 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
421 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
441 L S L S P G K

FIGURA 2B

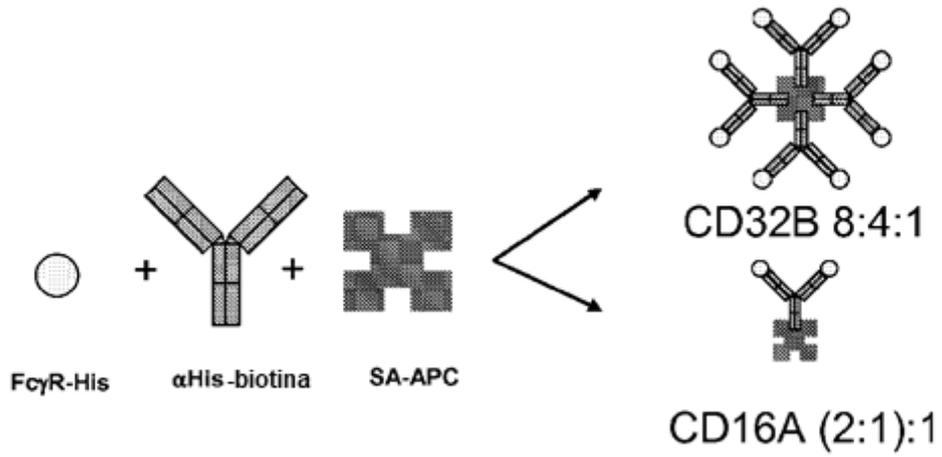


FIGURA 3

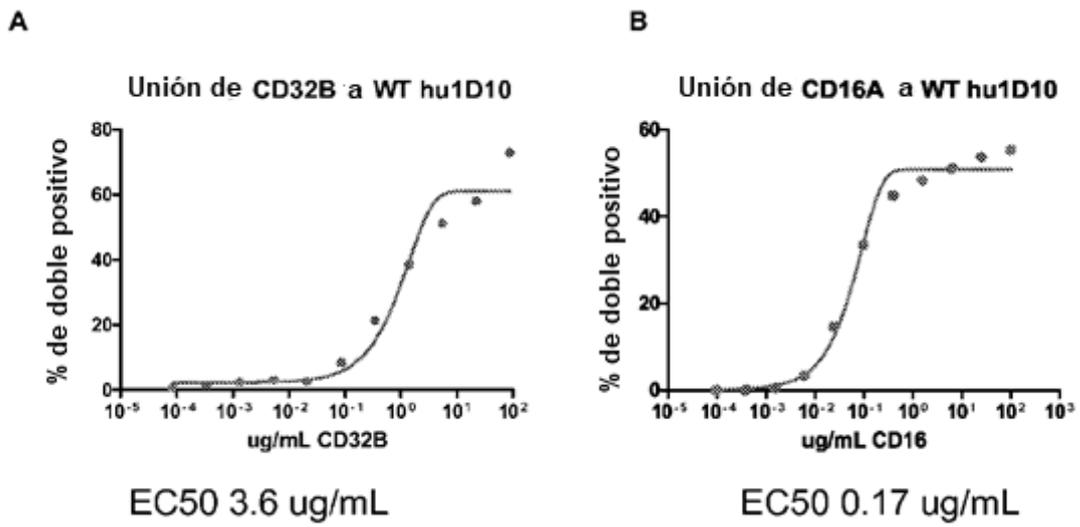


FIGURA 4

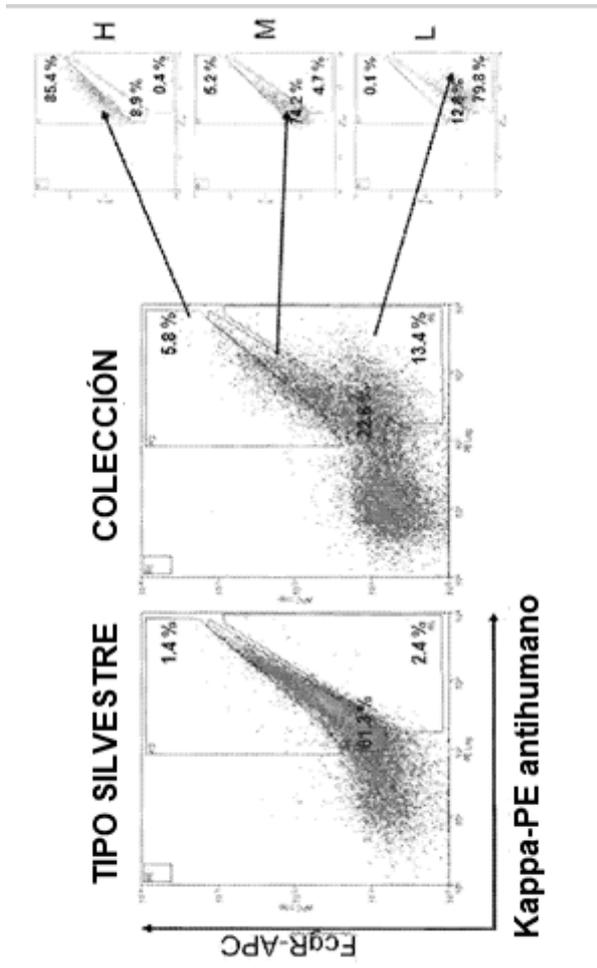


FIGURA 5

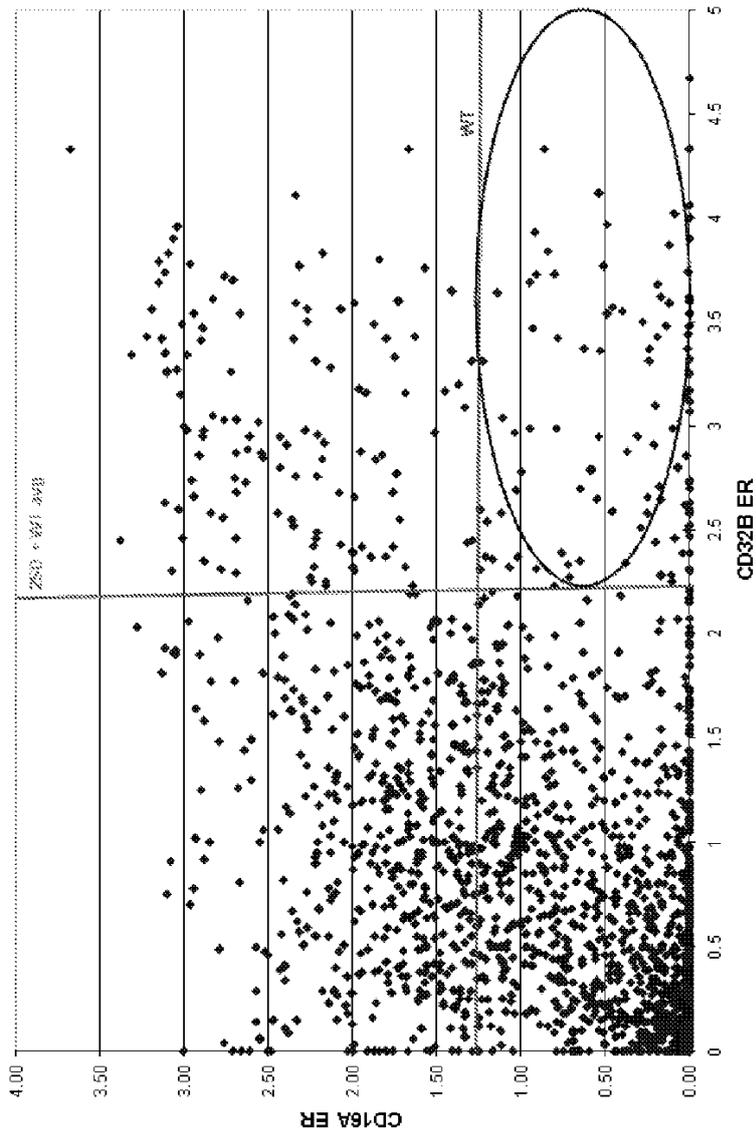


FIGURA 6

	WT-AA	EU	AA	CD32b_ER	CD16_ER
	V	263	L	2.25	0.10
	V	266	L	3.93	0.92
	V	273	C	2.70	0.65
	V	273	E	3.54	0.49
	V	273	F	4.00	0.00
	V	273	L	3.57	0.28
	V	273	M	3.74	0.01
	V	273	S	3.42	0.75
	V	273	Y	3.97	0.49
	V	305	K	2.14	1.25
	V	305	W	2.03	1.32
		WT			
control	N	297	A		
control	S	267	E		
control	L	328	F		
control		SELF			

FIGURA 7

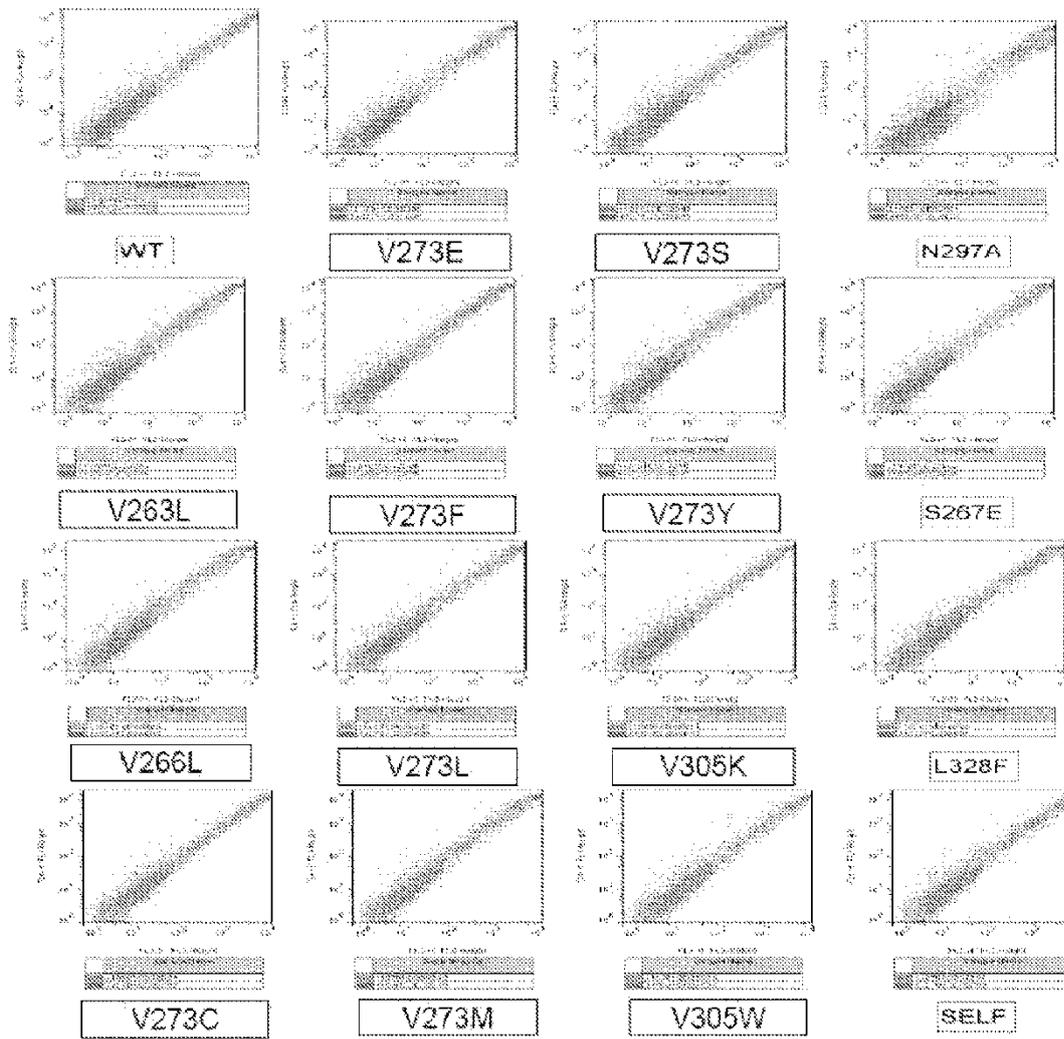


FIGURA 8

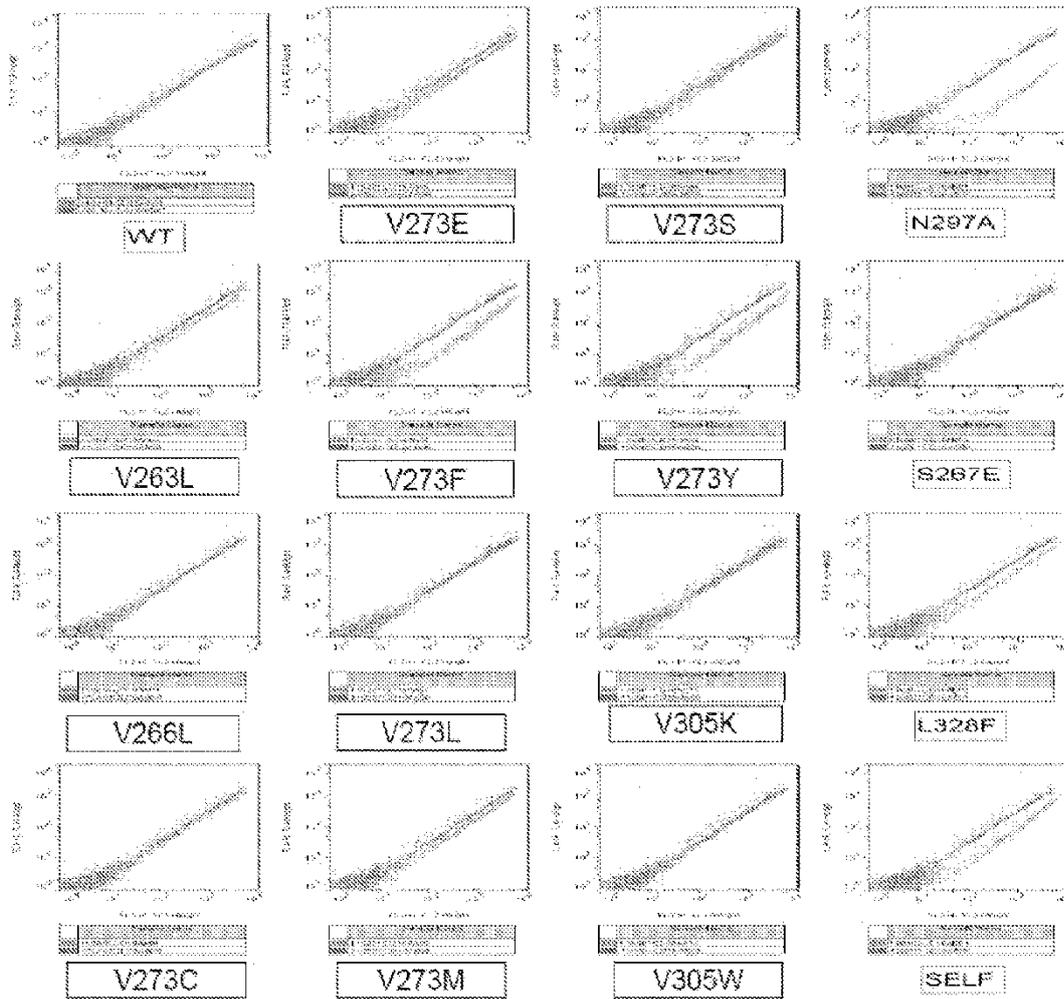


FIGURA 9

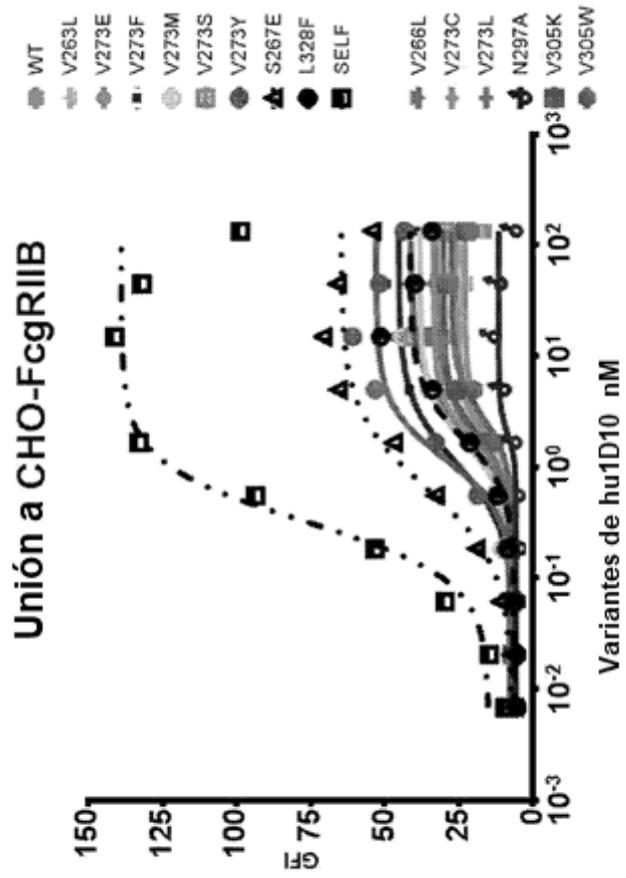


FIGURA 10A

	Variante	EC50 (nM)	Cantidad de veces respecto a WT
	WT	1.83	1.00
	V263L	1.80	1.02
	V266L	2.22	0.82
	V273C	2.03	0.90
	V273E	1.66	1.10
	V273F	1.08	1.70
	V273L	1.66	1.11
	V273M	1.63	1.12
	V273S	1.72	1.06
	V273Y	1.18	1.55
	V305K	1.93	0.95
	V305W	2.86	0.64
control	N297A	2.00	0.91
control	S267E	0.64	2.85
control	L328F	1.85	0.99
control	SELF	0.32	5.70

FIGURA 10B

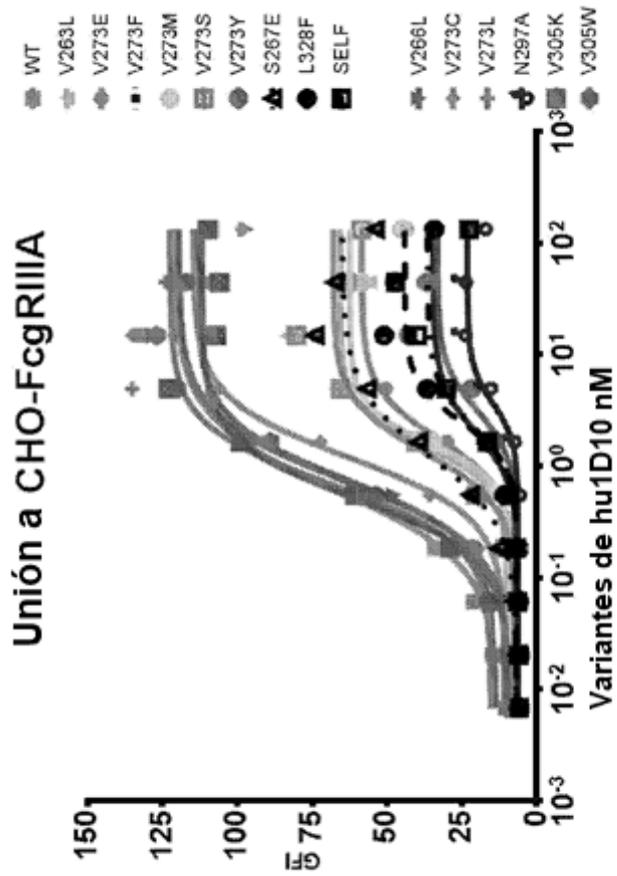
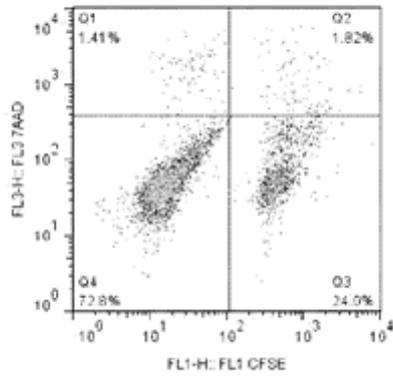


FIGURA 11A

	Variante	EC50 (nM)	Cantidad de veces respecto a WT
	WT	0.61	1.00
	V263L	1.52	0.40
	V266L	0.76	0.80
	V273C	1.19	0.51
	V273E	1.78	0.34
	V273F	2.01	0.30
	V273L	0.69	0.88
	V273M	1.59	0.38
	V273S	1.33	0.45
	V273Y	3.19	0.19
	V305K	0.51	1.18
	V305W	0.74	0.82
control	N297A	3.67	0.17
control	S267E	1.24	0.49
control	L328F	2.51	0.24
control	SELF	2.31	0.26

FIGURA 11B

A: 0.0 ug/mL WT hu1D10 = 7% de citotoxicidad



B: 1.0 ug/mL WT hu1D10 = 46% de citotoxicidad

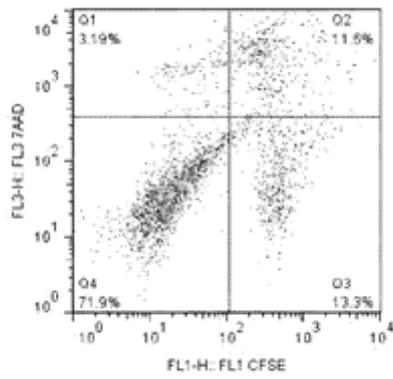


FIGURA 12

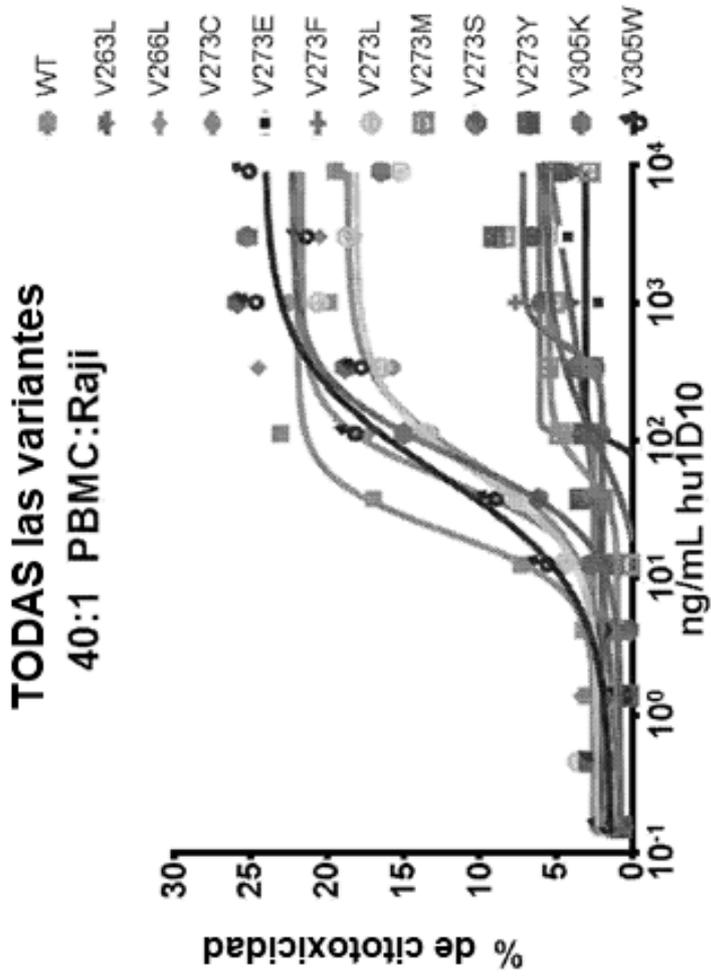


FIGURA 13A

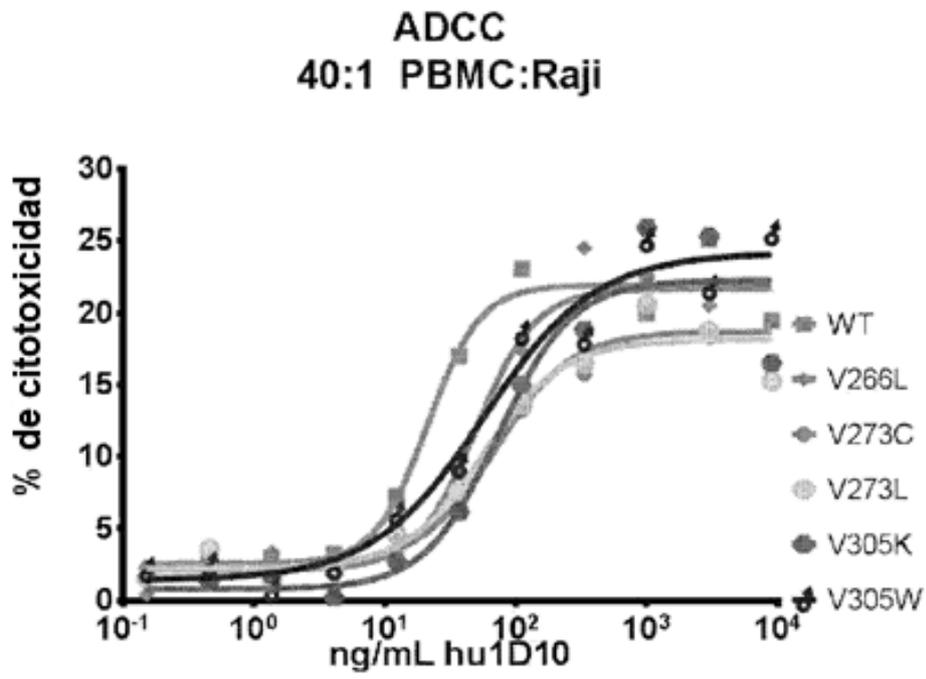


FIGURA 13B

NO ADCC
40:1 PBMC:Raji

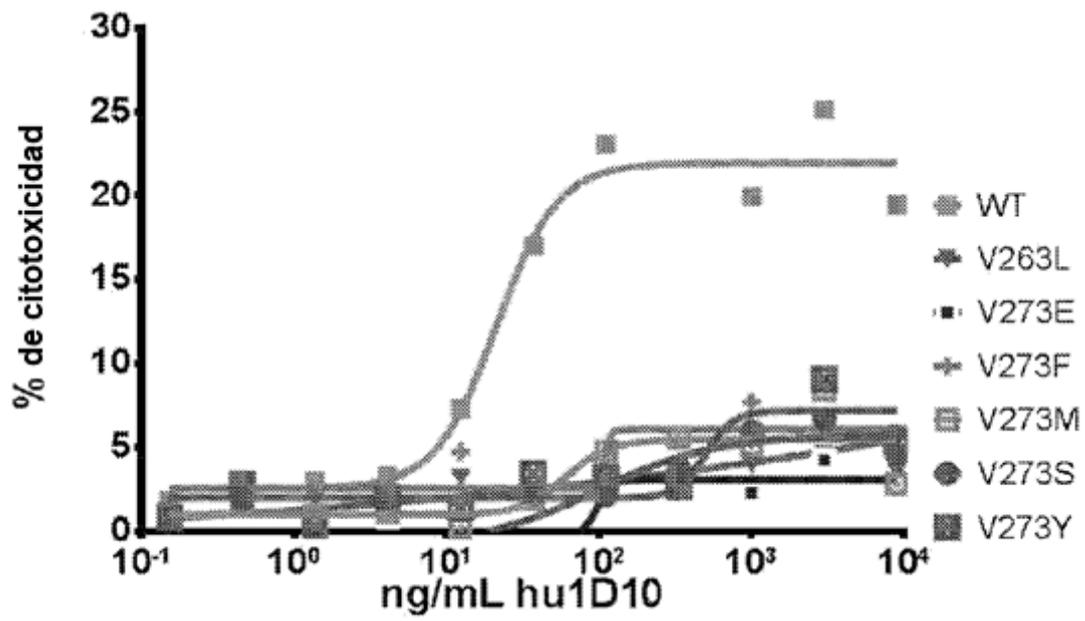


FIGURA 13C

ADCC
40:1 PBMC:Raji

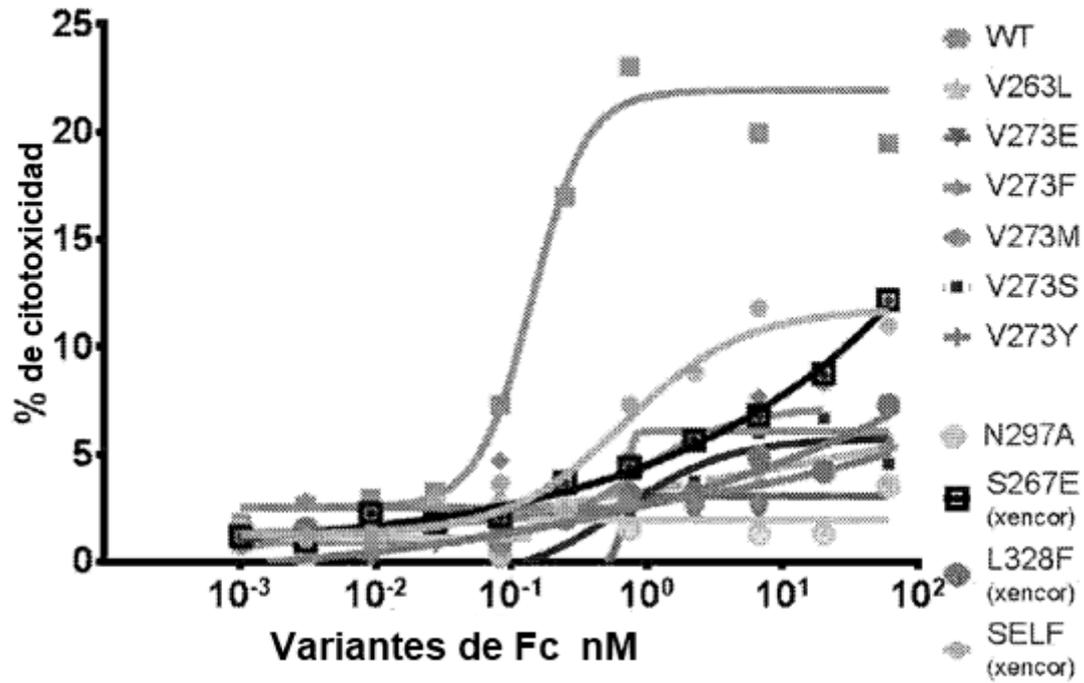


FIGURA 13D

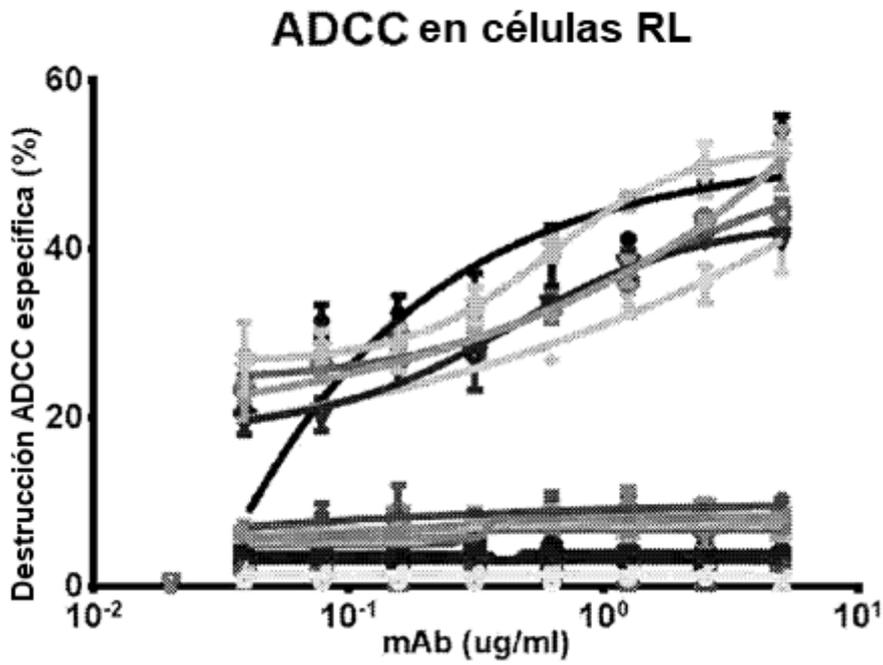


FIGURA 14A

mutaciones sin ADCC	mutaciones con ADCC	mAb de control sin ADCC
◆ V263L	◆ V266L	● WT CD40 G2
■ V273E	● V273C	● N297A
▲ V273F	▼ V273L	■ S267E
◆ V273M	◆ V305K	● L328F
◆ V273S	● V305W	■ SELF
◆ V273Y	◆ WT CD40 G1	● MSL109
		○ hlgG2
		● AICC

FIGURA 14B

**Producción de IL-12 p70 inducida por
mutantes de Fc ABR4021 (ADCC)**

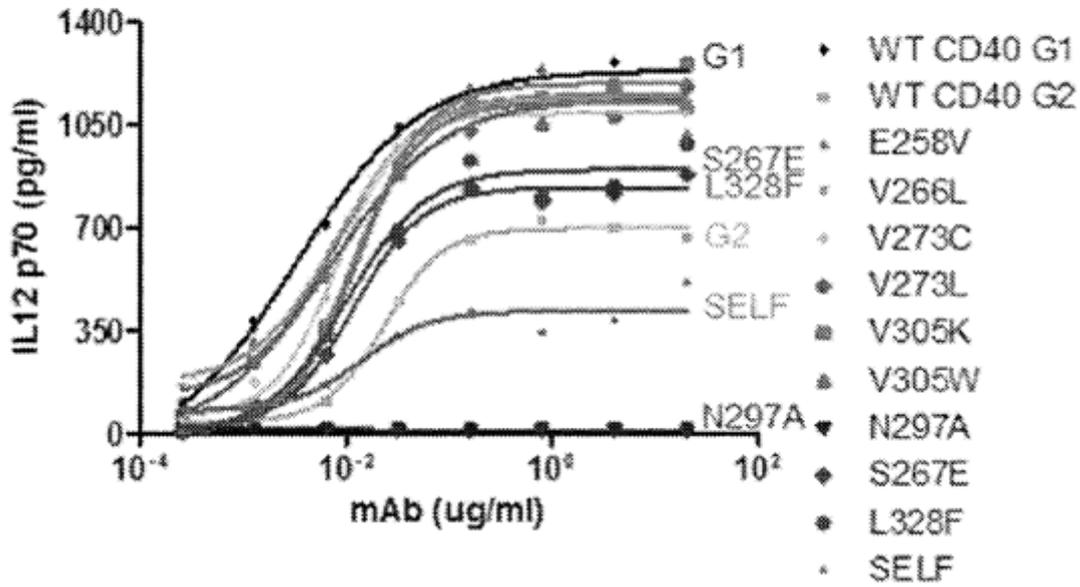


FIGURA 15A

**Producción de IL-12 p70 inducida por
mutantes de Fc ABR4021 G1 sin (ADCC)**

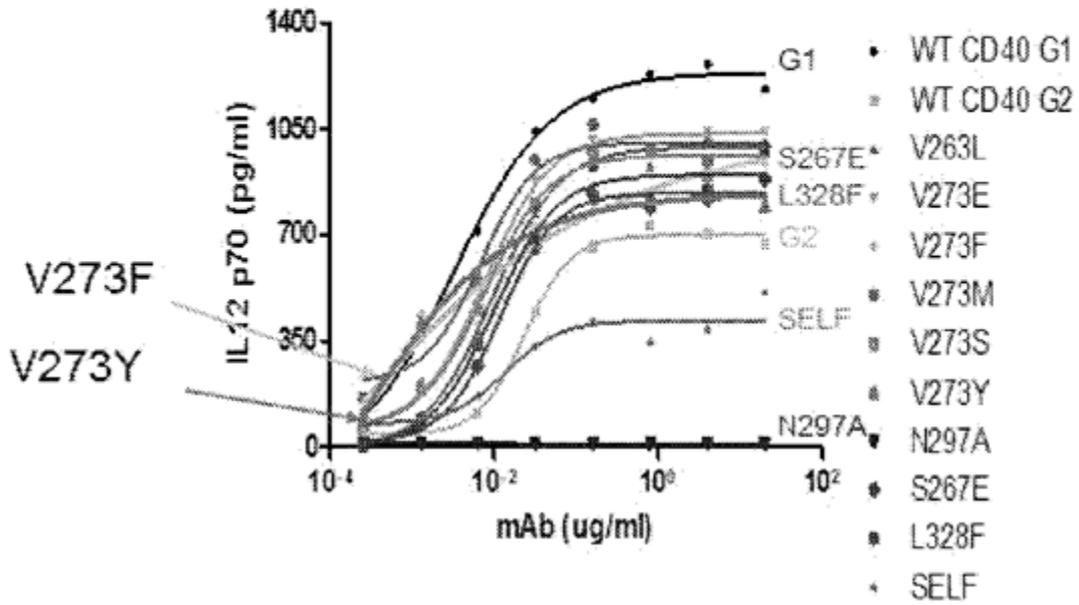


FIGURA 15B

	EC50. ng/ml.
WT CD40 G1	3.25
V263L	9.54
V273E	7.85
V273F	
V273M	6.95
V273S	7.74
V273Y	0.19
N297A	
S267E	11.80
L328F	10.05
SELF	13.97

FIGURA 15C

	WT-AA	<u>EU</u>	AA
	V	263	L
	V	266	L
	V	273	C
	V	273	E
	V	273	F
	V	273	L
	V	273	M
	V	273	S
	V	273	Y
	V	305	K
	V	305	W
		WT	
control	N	297	A
control	S	267	E
control	L	328	F
control		SELF	

FIGURA 16

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Patent documents cited in the description

- WO2005123780A
- WO9734631A
- 10 • WO02060919A
- US7632497B
- WO2009006520A
- US5807715A
- US4816567A
- 15 • US4816397A
- US5530101A
- US5585089A
- US5693761A
- US5693762A
- 20 • US6180370B
- EP239400A
- WO9109967A
- US5225539A
- EP592106A
- 25 • EP519596A
- US5565332A
- US4444887A
- US4716111A
- WO9846645A
- 30 • WO9850433PCT
- WO9824893PCT
- WO9816654PCT
- WO9634096PCT
- WO9633735PCT
- 35 • WO9110741PCT
- WO9824893A
- WO9201047PCT
- US5413923A
- US5625126A
- 40 • US5633425A
- US5569825A
- US5661016A
- US5545806A
- US5814318A
- 45 • US5885793A
- US5916771A
- US5939598A
- US5658570A
- US5681722A
- 50 • US5693780A
- US20110044980A
- US5736137A
- US5500362A

- US2003040426W
- US5677171A
- US4753894A
- US4943533A
- 5 • WO9640210A
- US6235883B
- US10172317B
- US5558864A
- WO9520045A
- 10 • US5891996A
- US6506883B
- WO0162931A2
- WO0188138A
- US20100266613A1
- 15 • US20100266613A
- US5168062A
- US4510245A
- US4968615A
- US4399216A
- 20 • US4634665A
- US5179017A
- WO8601533A
- EP0392745A
- WO2005117984A
- 25 • US5635483A
- US5780588A
- WO02088172A
- US7498298B
- US5208020A
- 30 • US5714586A
- US5712374A
- US5264586A
- US5773001A
- US5219996A
- 35 • US20040033228A1
- WO61791624A

Non-patent literature cited in the description

- 40 • **BLANK et al.**Immunol Rev., 2009, vol. 232, 159-71
- **CLARK**Chem. Immunol., 1997, vol. 65, 88-110
- **ALTSCHUL et al.**Nucl. Acids Res., 1997, vol. 25, 173389-402
- **HINTON et al.**J Biol Chem, 2004, vol. 279, 86213-6
- **SHIELDS et al.**J Biol Chem, 2001, vol. 276, 96591-604
- 45 • **MORRISON**Science, 1985, vol. 229, 47191202-7
- **OI et al.**BioTechniques, 1986, vol. 4, 214-221
- **GILLIES et al.**J Immunol Methods, 1985, vol. 125, 191-202
- **RIECHMANN et al.**Nature, 1988, vol. 332, 323-7
- **PADLAN**Mol Immuno, 1991, vol. 28, 489-498
- 50 • **STUDNICKA et al.**Prot. Eng., 1994, vol. 7, 805-814
- **ROGUSKA et al.**Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, vol. 91, 969-973
- **JESPERSEN et al.**Biotechnology, 1988, vol. 12, 899-903

- **GUGHAYUR**Methods in Enzymology, 2012, vol. 502, 25-41
- **WOLFSON**Chem. Biol., 2006, vol. 13, 101011-2
- **MURTHY et al.**Arch Biochem Biophys., 1987, vol. 252, 2549-60
- **RODECK et al.**J Cell Biochem., 1987, vol. 35, 4315-20
- 5 • **KETTLEBOROUGH et al.**Protein Eng., 1991, vol. 4, 7773-83
- **MODJTAHEDI et al.**J Cell Biophys., 1993, vol. 22, 1-3129-46
- **MODJTAHEDI et al.**Br J Cancer., 1993, vol. 67, 2247-53
- **MODJTAHEDI et al.**Br J Cancer, 1996, vol. 73, 2228-35
- **MODJTAHEDI et al.**Int J Cancer, 2003, vol. 105, 2273-80
- 10 • **MATEO et al.**Immunotechnology, 1997, vol. 3, 171-81
- **JUNGLUTH et al.**Proc Natl Acad Sci USA., 2003, vol. 100, 2639-44
- **CZAJKOWSKY et al.**EMBO Mol Med, 2012, vol. 4, 1015-1028
- **ROOPENIAKILESH**Nat Rev Immunol, 2007, vol. 7, 715-725
- **KONTERMANN**Curr Opin Biotechnol, 2011, vol. 22, 868-876
- 15 • **NIMMERJAHNRAVETCH**Nat Rev Immunol, 2008, vol. 8, 34-47
- **CERMERSKI et al.**Immunol. Lett., 2012, vol. 143, 34-43
- Molecular Cloning; A Laboratory ManualCold Spring Harbor19890000
- Current Protocols in Molecular BiologyGreene Publishing Associates19890000
- **GOEDEL**Gene Expression Technology: Methods in EnzymologyAcademic Press19900000vol. 185,
- 20 • **URLAUBCHASIN**Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, 4216-4220
- **KAUFMANSHARP**Mol. Biol., 1982, vol. 159, 601-621
- **BOSTROM et al.**Science, 2009, vol. 323, 1610-1614
- Solid Phase Peptide SynthesisThe Pierce Chemical Co.19840000
- **CHU et al.**Roche Molecular BiologicalsBiochemia No. 2, 2001,
- 25 • **FLANAGAN et al.**Monoclonal Antibodies: Methods and ProtocolsMethods in Molecular Biology, vol. 378,
- **FISHER**Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular BiologyElsevier19800000
- **HELLSTROM et al.**Controlled Drug Delivery19870000623-53
- **THORPE et al.**Immunol. Rev., 1982, vol. 62, 119-58
- **DUBOWCHIK et al.**Pharmacology and Therapeutics, 1999, vol. 83, 67-123
- 30 • **CHARI et al.**Cancer Research, 1992, vol. 52, 127-131
- **HINMAN et al.**Cancer Research, 1993, vol. 53, 3336-3342
- **LODE et al.**Cancer Research, 1998, vol. 58, 2925-2928
- **PARK et al.**Adv. Pharmacol., 1997, vol. 40, 399-435
- **MARTYSCHWENDENER**Methods in Molecular Medicine, 2004, vol. 109, 389-401
- 35 • Remington's Pharmaceutical Sciences19800000
- **SHI et al.**Leuk Lymphoma., 2002, vol. 43, 61303-12
- **LAW et al.**Cancer Res., 2005, vol. 65, 8331-8