

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 625**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 14163605 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2805969**

54 Título: **Variantes de Fc optimizadas**

30 Prioridad:

20.03.2009 EP 09305250

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

08.10.2019

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3, Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**BEHRENS, CHRISTIAN;
JORIEUX, SYLVIE;
KHARRAT, ABDELHAKIM;
BOUAYADI, KHALIL;
MONDON, PHILIPPE y
MONNET-MARS, CÉLINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 726 625 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 optimizadas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc. La mencionada variante exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor, y comprende al menos una modificación de aminoácidos en su región Fc.

Descripción de la técnica relacionada

10 Los anticuerpos monoclonales se usan como sustancias terapéuticas, para tratar una variedad de afecciones, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas, rechazo de trasplantes, enfermedades infecciosas, y enfermedades cardiovasculares. Actualmente, hay alrededor de veinte anticuerpos monoclonales o productos de fragmentos de anticuerpos monoclonales aprobados en el mercado, y más de cuatrocientos están en desarrollo clínico. A pesar de tal aceptación y promesa, existe todavía la necesidad significativa de optimizar las propiedades estructurales y funcionales de los anticuerpos.

15 Uno de los aspectos críticos en el uso de anticuerpos monoclonales en terapia es su persistencia en la circulación sanguínea. La velocidad de aclaramiento de los anticuerpos afecta directamente a la eficacia de la terapia, y en consecuencia, a la frecuencia y a la cantidad de administración de fármaco que pueden causar efectos adversos en el paciente e incrementar también los costes médicos.

20 IgG es la clase de inmunoglobulinas más prevalente en seres humanos, y también la más utilizada en terapéutica. El mecanismo de la homeostasis de IgG se ha elucidado a través de estudios relacionados con la transferencia de inmunidad pasiva desde la madre al feto o neonato en roedores (Brambell, 1966, *Lancet*; 2(7473):1087-93.; Rodewald, 1976, *J Cell Biol.*; 71(2):666-9; Jones et al., 1972, *J Clin Invest.*, 51(11):2916-27). En estudios tempranos, Brambell postuló que había un receptor para la transmisión maternofetal de IgG, y que el mecanismo implicado en la transferencia maternofetal de IgG y el catabolismo de IgG puede ser el mismo o, al menos, estrechamente relacionado (Brambell, 1966, *Lancet*; 2(7473):1087-93).

25 Los estudios han encontrado que el transporte de IgG en y a través de células polarizadas está mediado por la unión de la región Fc a un receptor Fc de alta afinidad, denominado receptor Fc neonatal (FcRn). El FcRn es un heterodímero que comprende una cadena α transmembránica con homología estructural con los dominios extracelulares de la cadena α de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, y una cadena ligera soluble que consiste en β_2 -microglobulina (β_2m) (Simister y Mostov, 1989, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*:54 Pt 1:571-80). En seres humanos, el FcRn se expresa en células de la placenta, en células epiteliales intestinales, de riñón y bronquiales, en células endoteliales y en células hematopoyéticas tales como macrófagos, monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos del intestino delgado (Zhu X et al., 2001, *J Immunol.*; 166:3266-76). FcRn se une a sus dos ligandos principales, IgG y albúmina sérica, de una manera dependiente del pH, con unión eficiente a pH 6,0-6,5 y con liberación a pH 7,0-7,5 (Raghavan et al., 1995, *Biochemistry.*, 34:14649-35 57).

40 El mecanismo propuesto para la protección de IgG frente al catabolismo es que las IgG se internalizan mediante pinocitosis no específica en los endosomas de las células endoteliales, en las que el bajo pH promueve la unión a FcRn (Ghetie y Ward, 1997, *Nat. Biotechnol.*, 15:637-40). Los complejos de IgG-FcRn unidos son reciclados nuevamente a la superficie celular y se disocian al pH neutro del fluido extracelular, volviendo a la circulación en la sangre. Las IgG que no se unen a FcRn circulan en los lisosomas, en los que son degradadas por proteasas. Según el mecanismo de catabolismo dependiente de la concentración para la supervivencia de IgG, a concentraciones bajas de IgG en suero, el receptor se uniría a toda IgG endocitosada, y la devolvería eficientemente a la circulación, produciendo una semivida de IgG prolongada. Por el contrario, a concentraciones elevadas de IgG, el receptor es saturado por IgG, y una fracción importante de la IgG queda sin unir por el receptor y circula para ser degradada, 45 produciendo un catabolismo más rápido de la IgG no unida.

Diversos experimentos de mutagénesis específica del sitio en la región Fc de las IgG de ratones han conducido a la identificación de ciertos restos de aminoácidos críticos implicados en la interacción entre IgG y FcRn (Kim et al., 1994, *Eur J Immunol.*; 24:2429-34; Kim et al., 1994, *Eur J Immunol*; 24:542-8; Medesan et al., 1996, *Eur J Immunol.*; 26:2533-6; Medesan et al., 1997, *J Immunol.*; 158:2211-7). Estos estudios, y los estudios de comparación de 50 secuencias, encontraron que la isoleucina en la posición 253, la histidina en la posición 310, y la histidina en la posición 435 (según la numeración de Kabat, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), están muy conservadas en las IgG humanas y de roedores, sugiriendo su importancia en la unión de IgG-FcRn. Estos restos de aminoácidos están situados en la interfaz de los dominios CH2-CH3, y el cartografiado del sitio funcional para estos restos es consistente con la estructura cristalográfica de rayos X de FcRn de rata complejado con Fc de rata (Burmeister et al., 55 1994, *Nature*; 372(6504):379-83).

Ghetie et al. (1997, Nat. Biotechnol; 15:637-40) mutagenizaron aleatoriamente la posición 252, la posición 254 y la posición 256 en un fragmento de Fc-bisagra de IgG1 de ratón. Un mutante mostró una afinidad tres y media veces mayor por FcRn de ratón y una semivida alrededor de 23% o 65% más prolongada en dos razas de ratón, respectivamente, en comparación con la del tipo salvaje.

5 Kim et al. (1999, Eur J Immunol; 29:2819-25) mutagenizaron IgG1 humana mediante sustituciones de aminoácidos en la posición 253, en la posición 310, o en la posición 435 de la región Fc. Encontraron que los fragmentos de Fc-bisagra mutantes tienen semividas séricas reducidas en ratones en comparación con el fragmento de Fc-bisagra de IgG1 de tipo salvaje, y concluyeron que Ile253, His310, e His435 desempeñan un papel central en la regulación de la semivida sérica de IgG.

10 Hornick et al. (2000, J Nucl Med., 41:355-62) mostraron que una única sustitución de aminoácido en la posición 253 en la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano quimérico acelera el aclaramiento en ratones y mejora la inmunoescintigrafía de tumores sólidos.

Shields et al. (2001, J Biol Chem; 276:6591-604) usaron mutagénesis por barrido de alanina para alterar restos en la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano, y después evaluaron la unión a FcRn humano. Las posiciones que abolieron la unión a FcRn cuando cambiaron a alanina incluyen I253, S254, H435, e Y436. Otras posiciones mostraron una reducción menos pronunciada en la unión, como sigue: E233-G236, R255, K288, L309, S415, y H433. Varias posiciones de aminoácidos exhibieron una mejora en la unión a FcRn cuando se cambiaron a alanina; entre éstas, son notables P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, E380, E382, S424, y N434. Muchas otras posiciones de aminoácidos exhibieron una ligera mejora (D265, N286, V303, K360, Q362, y A378) o ningún cambio (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444, y K447) en la unión a FcRn.

25 La aditividad más pronunciada se encontró para variantes de combinación con unión mejorada a FcRn. A pH 6,0, la variante E380A/N434A mostró una unión a FcRn alrededor de 8 veces mejor, con respecto a IgG1 nativa, en comparación con 2 veces para E380A y 3,5 veces para N434A. La adición de T307A a esto efectuó una mejora de 12 veces en la unión con respecto a IgG1 nativa.

30 Dall'Acqua et al. (2002, J Immunol.; 169:5171-80) describieron la mutagénesis al azar y el cribado de bibliotecas de presentación de fagos de fragmentos de bisagra-Fc de IgG1 humana frente a FcRn de ratón. Describieron mutagénesis al azar de las posiciones 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434, y 436. Las mejoras principales en la estabilidad del complejo de IgG1-FcRn humano se producen al sustituir restos situados en una banda a lo largo de la interfaz de Fc-FcRn (M252, S254, T256, H433, N434, e Y436), y en menor medida en sustituciones de restos en la periferia, como V308, L309, Q311, G385, Q386, P387, y N389. La variante con la afinidad más elevada por FcRn humano se obtuvo combinando las mutaciones M252Y/S254T/T256E y H433K/N434F/Y436H, y exhibió un incremento de 57 veces en la afinidad con respecto a la IgG1 de tipo salvaje.

35 Hinton et al. (2004, J Biol Chem.; 279:6213-6) describieron dos mutaciones, T250Q y M428L, que incrementaron la unión de IgG 2 a FcRn humano en alrededor de 3 y 7 veces, respectivamente. En combinación, estas dos mutaciones indujeron una capacidad de unión de IgG2 incrementada 28 veces. Inyectados en monos rhesus para estudios farmacocinéticos, ambos mutantes de IgG2, M428L y T250Q/M428L, mostraron semividas alrededor de 2 veces más prolongadas que el anticuerpo de tipo salvaje.

40 Dall'Acqua et al. (2006, J. Biol. Chem.; 281:23514-24) describieron una IgG1 humanizada anti-virus sincitial respiratorio, cuya región Fc se mutó en las posiciones 252, 254 y 256 (M252Y/S254T/T256E). Estas mutaciones incrementaron la unión a FcRn humano en alrededor de 10 veces a pH 6,0, mientras que permitieron una liberación eficiente a pH 7,4 (Dall'Acqua et al., 2002, J Immunol.; 169:5171-80). El comportamiento *in vivo* de tal IgG1 humana mutada exhibió un incremento de casi 4 veces en la semivida sérica en macacos en comparación con IgG 1 de tipo salvaje.

45 Adicionalmente, diversas publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (documento WO 97/43316; patente U.S. nº 5.869.046; patente U.S. nº 5.747.035; documentos WO 96/32478; WO 91/14438), o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn se conservan pero cuyas afinidades por otros receptores Fc se han reducido enormemente (documento WO 99/43713), o mediante fusión con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (documento WO 00/09560; patente U.S. nº 4.703.039).

50 La patente U.S. nº 6.165.745 describe un método para producir un anticuerpo con una menor semivida biológica introduciendo una mutación en el segmento de ADN que codifica el anticuerpo. La mutación incluye una sustitución de aminoácido en la posición 253, 310, 311, 433, o 434 del dominio de Fc-bisagra.

55 La publicación PCT nº WO 00/42072 describe un polipéptido que comprende una región Fc variante con afinidad de unión a FcRn alterada, polipéptido el cual comprende una modificación de aminoácido en una o más 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, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439, y 447 de la región Fc, en el que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU (Kabat et al., obra citada).

- 5 La publicación PCT nº WO 02/060919 A2 describe una IgG modificada que comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de IgG de tipo salvaje, en la que la IgG modificada tiene una mayor semivida en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo salvaje, y en la que la una o más modificaciones de aminoácidos están en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-435.

Todavía existe la necesidad en la técnica de nuevas variantes de Fc optimizadas.

10 Sumario de la invención

La presente invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona una variante de un polipéptido progenitor con propiedades optimizadas. Las propiedades optimizadas comprenden una mayor propiedad de unión a FcRn que el polipéptido progenitor correspondiente.

- 15 En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante de la invención.

En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la variante de la invención.

En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona un vector que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente.

- 20 En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona una célula hospedante que contiene un vector descrito anteriormente.

En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona un método para producir una variante de polipéptido, que comprende cultivar la célula hospedante descrita anteriormente de manera que se exprese el ácido nucleico.

- 25 En otra realización, se proporciona un medicamento que comprende una variante de la invención.

En otra realización, la invención como se define mediante las reivindicaciones anejas proporciona el uso de una variante de la invención para la fabricación de un medicamento.

En otra realización, se proporciona un método para identificar variantes optimizadas de Fc.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La Figura 1 muestra el vector fagémido pMG58 en el que se clonó el gen de Fc humano que codifica los restos de aminoácidos 226-447 (índice EU como en Kabat) derivados de una cadena pesada de IgG1 humana (Fc226, SEQ nº1).

CVDE: parte C-terminal de la endonucleasa derivada de VMA1, VMA: subunidad de ATPasa vacuolar (VMA), CPIII: parte C-terminal de la proteína de la cápside pIII (o p3) del fago M13.

- 35 La Figura 2 muestra los métodos usados para la selección de variantes de Fc en fase sólida (2A) y en disolución (2B). FcRn-biot se refiere a FcRn biotinilado, y FcRn-p3 se refiere a la proteína de fusión FcRn-p3. El fago de Fc es el bacteriófago M13 que expresa una variante de Fc en su cápside. En la selección en fase sólida, los pocillos de las inmunoplasmas se revisten con la proteína de fusión FcRn-p3 (Fc-Rn-p3) o con neutravidina, seguido de FcRn-biot.

- 40 La Figura 3 muestra el principio del ensayo de ELISA de fagos llevado a cabo en variantes de Fc seleccionadas. El fago de Fc es un bacteriófago M13 que expresa una variante de Fc en su cápside. FcRn-p3 es una proteína de fusión FcRn-p3 revestida sobre pocillos de inmunoplasmas. Anti-M13 se refiere al anticuerpo de ratón anti-M13 fusionado a peroxidasa de rábano picante (HRP), usado para la detección de ELISA.

- 45 La Figura 4 muestra un histograma que representa, para cada posición de aminoácido de IgG1 de Fc, el porcentaje de mutantes que comprenden una modificación en dicha posición. Coordenada X: número de aminoácido según el índice EU, como en Kabat, de la posición mutada. Coordenada Y: porcentaje de variantes de Fc que contienen la posición mutada.

- 50 La Figura 5a muestra el principio del ensayo ELISA dedicado a medir la afinidad de unión de variantes de Fc por FcRn. FcRn-p3 es una proteína de fusión FcRn-p3 revestida sobre pocillos de inmunoplasmas. Fc es una

variante de Fc que comprende la etiqueta V5 para la detección mediante ELISA. Anti-V5 es un anticuerpo Anti-V5 fusionado a HRP. El anticuerpo se usa para la detección mediante ELISA.

5 La Figura 5b muestra la curva de efecto frente a la dosis para Fc de tipo salvaje (círculos) y para la variante Fc-H (cuadrados) obtenida mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido a polipéptido Fc.

La Figura 5c muestra las curvas de efecto frente a la dosis para Fc de tipo salvaje (círculos) y para la variante S3A_07 (cuadrados) obtenidas mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido a polipéptido Fc.

10 La Figura 5d muestra las curvas de efecto frente a la dosis para Fc de tipo salvaje (círculos) y para la variante S5A_41 (cuadrados) obtenidas mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido a polipéptido Fc.

15 La Figura 6 muestra los alineamientos de secuencias de IgG1 humana nativa que se refieren a las posiciones 216-447 (según el índice EU en Kabat) con las secuencias correspondientes de IgG2 humana (SEQ ID NO:14), IgG3 humana (SEQ ID NO:15) e IgG4 humana (SEQ ID NO:16). Las secuencias de IgG1 se refieren al alotipo G1m1,17 (SEQ ID NO:12) y al alotipo G1m3 (SEQ ID NO:13). El dominio de "bisagra inferior-CH2-CH3" de IgG1 comienza en la posición 216 (véase la flecha).

20 La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos ELISA que se llevaron a cabo para mostrar la afinidad de unión de la variante de Fc por FcRn a distintos pH (para más detalles, véase el Ejemplo 2, parte IV.2). El histograma representa, para cada variante, el valor de OD_{450nm} medido para el ensayo ELISA llevado a cabo a pH = 6 (barras negras), a pH 6,5 (barras blancas) o a pH = 7,4 (barras grises). El valor de OD_{450nm} se correlaciona con la cantidad de FcRn inmovilizado unido a variantes de Fc.

25 La Figura 8a ilustra un mapa esquemático del vector de expresión que se usa para expresar anticuerpos IgG1 recombinantes que poseen variantes de Fc como se describe aquí. Los anticuerpos IgG1 recombinantes resultantes poseen especificidad de unión por el antígeno CD20. Como se muestra en la Figura 8a, el ácido nucleico que codifica la región constante de cadena pesada que posee las mutaciones descritas en la memoria descriptiva y en los ejemplos se inserta entre los sitios de clonación Apal y Asc1 presentes en el vector HKCD20-Opti-GA.

30 Las Figuras 8b y 8c muestran SDS-PAGE de variantes de IgG en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras, respectivamente.

35 (1) se refiere a IgG que comprende Fc de tipo salvaje; (2) se refiere a IgG que comprende la variante de Fc-H; (3) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_69; (4) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_78; (5) se refiere a IgG que comprende la variante T5A_74; (6) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_74, (7) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_60, y (8) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_66.

40 La Figura 9 muestra la curva de efecto frente a la dosis para variantes de IgG de la invención ("1") e IgG de tipo salvaje ("2") obtenida mediante el ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 2, III.1 para caracterizar la unión de variantes de IgG a FcRn. Coordenada X: concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido a IgG.

45 La Figura 10 muestra las curvas de efecto frente a las dosis obtenidas mediante ensayo ELISA para variantes de IgG de la invención a fin de caracterizar su afinidad por FcγRIIIa. (1) se refiere a la curva obtenida para la variante C6A_66, (2) se refiere a la curva obtenida para Rituximab, y (3) se refiere a las curvas obtenidas para las variantes C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60, e IgG de tipo salvaje. El ensayo ELISA se realizó como se describe en el Ejemplo 2, en la parte IV.1.a. Coordenada X: concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de FcγRIIIa unido a IgG.

50 La Figura 11 ilustra la unión de diversas IgG recombinantes a FcRn de Jurkat. La Figura 11 muestra la unión de Ritixan o de diversas variantes según la invención a FcRn de Jurkat, que se ha determinado como se describe en la sección Materiales y Métodos anterior, y que se ha expresado como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI).

55 La Figura 12 muestra las curvas de efecto frente a las dosis obtenidas en el ensayo de ADCC para variantes de IgG de la invención. (1) se refiere a la curva de la variante C6A_66, (2) se refiere a la curva de Rituximab, y (3) se refiere a las curvas de LFB-R603, WT-IgG, y variantes de IgG de la invención (a saber, variantes C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60). Coordenada X: concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de lisis celular.

Descripción detallada de la invención

A fin de que la solicitud se entienda de forma más completa, se exponen más abajo varias definiciones. Tales definiciones pretenden englobar equivalentes gramaticales.

- 5 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la numeración de los restos en la región Fc es la de la cadena pesada de inmunoglobulina según el índice EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo de EU de IgG1 humana.

Por "polipéptido" o "proteína", como se usan aquí, se quiere decir al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptido, oligopéptidos y péptidos.

- 10 Por "aminoácido", como se usa aquí, se quiere decir uno de los 20 aminoácidos de origen natural, o cualesquiera análogos no naturales que puedan estar presentes en una posición definida específica.

Los aminoácidos de origen natural se pueden abreviar con un código de tres letras, o con un código de una letra:

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	ala	A
Arginina	arg	R
Asparagina	asn	N
Ácido aspártico	asp	D
Asparagina o ácido aspártico	asx	B
Cisteína	cys	C
Ácido glutámico	glu	E
Glutamina	gln	Q
Glutamina o ácido glutámico	glx	Z
Glicina	gly	G
Histidina	his	H
Isoleucina	ile	I
Leucina	leu	L
Lisina	lys	K
Metionina	met	M
Fenilalanina	phe	F
Prolina	pro	P
Serina	ser	S
Treonina	thr	T
Triptófano	try	W
Tirosina	tyr	Y
Valina	val	V

- 15 Por "posición", como se usa aquí, se quiere decir una localización en la secuencia de una proteína. Para la región Fc, las posiciones se numeran según el índice EU como en Kabat.

- 20 Por "modificación de aminoácido" se quiere decir aquí un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Las "modificaciones de aminoácidos", que también se pueden denominar aquí "cambios de aminoácidos", incluyen sustitución, inserción, y/o supresión de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" se quiere decir aquí la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución N434S se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en el que la asparagina en la posición 434 se sustituye por serina. Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa aquí, se quiere decir la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. Por ejemplo, el inserto G>235-236 designa una inserción de glicina entre las posiciones 235 y 236. Por "supresión de aminoácido" o "supresión", como se usa aquí, se quiere decir la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. Por ejemplo, E294del designa la supresión de ácido glutámico en la posición 294.

Por ejemplo, preferentemente se usa el siguiente formato de modificaciones: 434S, o N434S, significa que el aminoácido progenitor en la posición 434, es decir, asparagina, se sustituye por serina.

- 30 En el caso de una combinación de sustituciones, el formato preferido es el siguiente: 259I/315D/434Y o V259I/N315D/N434Y. Eso significa que hay tres sustituciones en la variante, una en la posición 259, una en la posición 315, y una en la posición 434, y que el aminoácido en la posición 259 del polipéptido progenitor, es decir, valina, se sustituye por isoleucina, que el aminoácido en la posición 315 del polipéptido progenitor, es decir,

asparagina, se sustituye por ácido aspártico, y que el aminoácido en la posición 434 del polipéptido progenitor, es decir, asparagina, se sustituye por tirosina.

5 Por "región variable", como se usa aquí, se quiere decir la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes $V\kappa$, $V\lambda$, y/o VH que forman los loci genéticos inmunoglobulínicos de la cadena kappa, lambda, y pesada, respectivamente. Las regiones variables comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones estructurales (FR).

10 Por "Fc" o "región Fc", como se usa aquí, se quiere decir el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, excluyendo el primer dominio inmunoglobulínico de región constante. De este modo, Fc se refiere a los últimos dos dominios inmunoglobulínicos de región constante de IgA, IgD, e IgG, y los últimos tres dominios inmunoglobulínicos de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios inmunoglobulínicos Cgamma2 y Cgamma3 (C γ 2 y C γ 3, que son los dominios CH2 y CH3, respectivamente, para las IgG) y la región de bisagra inferior entre Cgamma1 (C γ 1) y Cgamma2 (C γ 2). La región Fc de cadena pesada de IgG1 humana definida aquí comprende los restos C226 hasta su término carboxilo, en la que la numeración es según el índice EU como en Kabat. En el contexto de una IgG1 humana, la bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340, y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. La región Fc correspondiente de otras inmunoglobulinas se puede identificar mediante alineamientos de secuencia.

15 Fc se puede referir a esta región sola, o a esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, como se describe más abajo. Por "polipéptido de Fc", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados, conjugados de Fc, y fragmentos de Fc.

20 El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio. "Anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al menos (i) una región Fc y (ii) un dominio de polipéptido de unión derivado de una región variable de una inmunoglobulina. El mencionado dominio de polipéptido de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana dado o a un grupo de antígenos diana. Un dominio de polipéptido de unión que deriva de una región variable de una inmunoglobulina comprende una o más CDR. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, proteína de fusión de Fc que comprende al menos una región variable, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados aquí como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, proteínas de fusión de anticuerpos, conjugados de anticuerpos, y fragmentos de cada uno respectivamente.

25 Por "anticuerpo de longitud completa" o por "inmunoglobulina", como se usa aquí, se quiere decir la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. "Anticuerpo de longitud completa" cubre anticuerpos de longitud completa monoclonales, anticuerpos de longitud completa de tipo salvaje, anticuerpos de longitud completa quiméricos, anticuerpos de longitud completa humanizados, no siendo la lista limitante.

30 En la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, la estructura de anticuerpos de longitud completa es generalmente un tetrámero. Dicho tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y llamas, los anticuerpos de longitud completa pueden consistir en solamente dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada un dominio variable unido a la región Fc.

35 La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. En la región variable, tres bucles se reúnen para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera, para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina una región determinante de la complementariedad (en lo sucesivo denominada aquí como "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es la más significativa.

40 La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En base al grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y la estructura, e hicieron una lista de ellas (véase Sequences of Immunological Interest, 5ª edición, publicación NIH, No. 91-3242, E. A. Kabat et al.).

45 En el caso de inmunoglobulinas humanas, las cadenas ligeras se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. De este modo, "isotipo", como se usa aquí, quiere decir cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de las inmunoglobulinas humanas son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

5 Por "IgG", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen reconocido de inmunoglobulina gamma. En seres humanos, IgG comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En ratones, IgG comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Las IgG de longitud completa son tetrámeros, y consisten en dos pares idénticos de dos cadenas inmunoglobulínicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo cada cadena ligera los dominios inmunoglobulínicos VL y CL, y comprendiendo cada cadena pesada los dominios inmunoglobulínicos VH, C γ 1 (también denominado CH1), C γ 2 (también denominado CH2), y C γ 3 (también denominado CH3). En el contexto de una IgG1 humana, "CH1" se refiere a las posiciones 118-220, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340, y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447, según el índice EU como en Kabat. La cadena pesada de IgG también comprende un dominio de bisagra, que se refiere a las posiciones 221-236 en el caso de IgG1.

15 Por "polipéptido progenitor" o "progenitor polipeptídico", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido no modificado que se modifica subsiguientemente para generar una variante. Dicho polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural, una variante de un polipéptido de origen natural, una versión manipulada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural o un polipéptido sintético. El polipéptido progenitor se puede referir al propio polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En el contexto de la presente invención, el polipéptido progenitor comprende una región Fc seleccionada del grupo de regiones Fc de tipo salvaje, sus fragmentos y sus mutantes. En consecuencia, el polipéptido progenitor puede comprender opcionalmente modificaciones de aminoácidos preexistentes en su región Fc (es decir, un mutante de Fc), en comparación con las regiones Fc de tipo salvaje.

20 Ventajosamente, el polipéptido progenitor es un anticuerpo, una inmunoglobulina, un polipéptido de fusión de Fc, un conjugado de Fc, no siendo la lista limitante. En consecuencia, por "inmunoglobulina progenitora", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido inmunoglobulínico que se modifica para generar una inmunoglobulina variante, y por "anticuerpo progenitor", como se usa aquí, se quiere decir un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante. Se debería observar que "anticuerpo progenitor" incluye, pero no se limita a, anticuerpos comerciales conocidos, producidos recombinantemente.

25 Como se usa aquí, la expresión "al menos un" es igual a "uno o más".

Por "polipéptido variante", "variante polipeptídica" o "variante", como se usa aquí, se quiere decir una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

30 Variante se puede referir a variante de Fc, variante de polipéptido de Fc, variante proteica, variante de anticuerpo, variante de inmunoglobulina, variante de IgG, no siendo esta lista limitante.

35 Por "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usa aquí, se quiere decir una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido WT.

Los polipéptidos progenitores de interés son polipéptidos que comprenden una región Fc como se define anteriormente. Preferiblemente, la variante de la invención tiene una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En consecuencia, una variante de interés comprende una variante de Fc.

40 En consecuencia, por "variante de Fc" o "Fc variante", como se usa aquí, se quiere decir una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Una variante de Fc puede ser una región Fc aislada y sus fragmentos, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión de Fc, y sus fragmentos, no siendo la lista limitante.

45 Por "variante proteica" o "proteína variante", como se usa aquí, se quiere decir una proteína que difiere de una proteína progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante", como se usa aquí, se quiere decir un anticuerpo que difiere de un anticuerpo progenitor en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de IgG" o "IgG variante", como se usa aquí, se quiere decir un anticuerpo que difiere de una IgG progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Preferiblemente, la variante tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido progenitor, por ejemplo de alrededor de 1 a alrededor de 45 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 20 modificaciones de aminoácidos, y más preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 10 modificaciones de aminoácidos.

La secuencia variante aquí poseerá preferiblemente al menos alrededor de 80% de identidad con su secuencia polipeptídica progenitora, y lo más preferible al menos alrededor de 90% de identidad.

55 Como se pretende aquí, un polipéptido determinado que tiene al menos alrededor de 90% de identidad de aminoácidos con un polipéptido de referencia posee al menos alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% identidad de aminoácidos con el mencionado polipéptido de referencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. Por ejemplo, se pueden introducir saltos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos para el alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas se pueden descartar con fines comparativos. Con fines de comparación óptima, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede lograr con CLUSTAL W (versión 1.82), con los siguientes parámetros: (1) MODO DE CPU = ClustalW mp; (2) ALINEAMIENTO = "completo"; (3) FORMATO DE SALIDA = "aln w/NÚMEROS"; (4) ORDEN DE SALIDA = "alineado"; (5) ALINEAMIENTO DE COLOR = "no"; (6) KTUP (tamaño de palabra) = "por defecto"; (7) LONGITUD DE LA VENTANA = "por defecto"; (8) TIPO DE PUNTUACIÓN = "porcentaje"; (9) TOPDIAG = "por defecto"; (10) PAIRGAP = "por defecto"; (11) ÁRBOL FILOGENÉTICO/TIPO DE ÁRBOL = "ninguno"; (12) MATRIZ = "por defecto"; (13) SALTO ABIERTO = "por defecto"; (14) SALTOS DE EXTREMOS = "por defecto"; (15) EXTENSIÓN DEL SALTO = "por defecto"; (16) DISTANCIAS DE SALTOS = "por defecto"; (17) TIPO DE ÁRBOL = "cladograma"; y (18) DISTANCIAS DE SALTOS DE ÁRBOL = "ocultar".

Por "tipo salvaje o WT" se quiere decir aquí una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que no se ha modificado intencionadamente.

Por "FcRn" o "receptor de Fc neonatal", como se usa aquí, se quiere decir una proteína que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y es codificada al menos en parte por un gen FCRN. El FcRn puede ser de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Como se sabe en la bibliografía, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, denominados a menudo como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina, y la cadena pesada es codificada por el gen FCRN. Excepto que se señale de otro modo aquí, FcRn o proteína FcRn se refiere al complejo de cadena α con beta-2-microglobulina. En ser humano, el gen que codifica FcRn se denomina FCGRT.

Por "mayor unión a FcRn", como se usa aquí, se quiere decir el incremento en la afinidad de unión, in vivo o in vitro, de la variante de la invención por FcRn, en comparación con el polipéptido progenitor. La capacidad de la variante polipeptídica para unirse a un FcRn se puede evaluar in vitro mediante ELISA (Ejemplo 1, parte IV.1.a) o tecnología SPR (Ejemplo 1 parte IV.1.b.). Las variantes que tienen una propiedad de unión potenciada por FcRn tienen muy a menudo una mayor retención sérica in vivo, y de este modo, una mayor semivida.

A fin de incrementar la retención de la región Fc in vivo, el incremento en la afinidad de unión por FcRn debe ocurrir a pH de alrededor de 6, mientras que se mantiene una menor afinidad a pH de alrededor de 7,4.

Aunque todavía bajo examen, se cree que las regiones Fc tienen una semivida más prolongada in vivo, debido a que la unión a FcRn a pH 6 permite secuestrar regiones Fc en endosomas (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598). El compartimiento endosómico recicla entonces las regiones Fc hacia la superficie celular. Una vez que el compartimiento se abre al espacio extracelular, el mayor pH, casi 7,4, induce la liberación de regiones Fc nuevamente a la sangre. Por lo tanto, las modificaciones de aminoácidos en la región Fc, que incrementarán la semivida de las regiones Fc in vivo, incrementarán de forma ideal la unión a FcRn al menor pH, a la vez que todavía permiten la liberación de la región Fc a mayor pH.

La expresión "semivida in vivo", como se usa aquí, se refiere a una semivida biológica de un polipéptido de interés en la circulación de un animal dado, y se representa por el tiempo requerido para que la mitad de la cantidad presente en la circulación del animal se aclare de la circulación y/u otros tejidos en el animal.

La presente invención se basa en la identificación de modificaciones de aminoácidos de la región Fc, modificaciones las cuales incrementan la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. Las modificaciones de aminoácidos de interés se han determinado generando dos bibliotecas de variantes de Fc mediante mutagénesis al azar, y midiendo la propiedad de unión de dichas variantes para FcRn.

En consecuencia, la presente invención se refiere a variantes de polipéptidos progenitores que comprenden un región Fc que presenta una mayor unión a FcRn en comparación con dichos polipéptidos progenitores.

Un polipéptido progenitor de la invención es un polipéptido que comprende una región Fc. Dicho polipéptido puede comprender una única cadena polipeptídica o varias cadenas polipeptídicas, que no están enlazadas covalentemente juntas. Los polipéptidos progenitores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, proteínas de fusión de Fc, conjugados de Fc, polipéptidos derivatizados de Fc, Fc aislado, y fragmentos de los mismos. Como consecuencia, dicho polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural, una variante de un polipéptido de origen natural, una versión manipulada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural, un polipéptido sintético, o un polipéptido que comprende un fragmento no proteínico. Una versión manipulada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural es un polipéptido que no está codificado por un gen de origen natural. Por ejemplo, el polipéptido manipulado mediante ingeniería puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

La región Fc del polipéptido progenitor se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de IgG, fragmentos y mutantes de las mismas. Aquí, región Fc de IgG corresponde al dominio de "bisagra

inferior"-CH2-CH3 (para las IgG, CH2 y CH3 también se denominan dominios C γ 2 y C γ 3). La secuencia del dominio de "bisagra inferior"-CH2-CH3 de la IgG1 humana de tipo salvaje es la secuencia de SEQ ID NO:1. En el contexto de IgG1 humana, la bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340, y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. Los dominios análogos para otras subclases de IgG se pueden determinar a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas o fragmentos de cadenas pesadas de dichas subclases de IgG con la de IgG1 humana.

Los fragmentos de región Fc se definen como polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos derivados de una región Fc de tipo salvaje, preferiblemente del dominio de "bisagra inferior-CH2-CH3" de una IgG de tipo salvaje. Los mencionados fragmentos tienen una constante de disociación para FcRn menor que 1 micraM, según el ensayo de SPR descrito en el Ejemplo 1, parte IV.1.).

Como se menciona anteriormente, el polipéptido progenitor puede comprender un mutante de Fc de tipo salvaje, es decir, una región Fc que ya comprende modificaciones de aminoácidos preexistentes, tales como adiciones, inserciones y/o sustituciones, con la condición de que el mencionado mutante de Fc tenga una constante de disociación para FcRn menor que 1 micraM según el ensayo de SPR descrito en el Ejemplo 1, parte IV.1., y no es una región Fc de tipo salvaje.

Por "polipéptido variante" o "variante", como se usa aquí, se quiere decir una secuencia polipeptídica que difiere de la de un polipéptido progenitor en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

El polipéptido variante según la presente invención presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor correspondiente. En otras palabras, la afinidad de la variante para FcRn es mayor que la del polipéptido progenitor. Tales variantes son variantes optimizadas según la invención.

La afinidad de los mencionados polipéptidos por FcRn se puede evaluar mediante métodos bien conocidos de la técnica anterior. Por ejemplo, el experto en la técnica puede determinar la constante de disociación (Kd) usando experimentos de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), como se ilustra en el Ejemplo 1, parte IV.1.b., de la presente solicitud. Si la variante tiene una Kd 1,1 veces menor que la de su progenitor correspondiente, entonces la mencionada variante es una variante optimizada según la descripción.

Como alternativa, el experto en la técnica puede llevar a cabo un ensayo ELISA apropiado. Un ensayo ELISA apropiado permite comparar la fortaleza del enlace de la variante y la del progenitor frente a FcRn, como se ilustra en el Ejemplo 1. Se comparan las señales específicas detectadas para variante y para el polipéptido progenitor. La variante es una variante optimizada de la descripción si su señal específica es al menos 1,2 veces más fuerte, más preferiblemente al menos 3,2 veces más fuerte que la del polipéptido progenitor (es decir, al menos tan buena como la variante de Fc que tiene la modificación doble de aminoácido T250Q/M428L).

Los ensayos ELISA apropiados se ilustran en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. La afinidad de unión se puede determinar indiferentemente evaluando los polipéptidos de longitud completa (véase el Ejemplo 2, parte III), o evaluando sus regiones Fc aisladas (véase el Ejemplo 1, parte IV).

Según la descripción, las variantes polipeptídicas de interés comprenden al menos una modificación de aminoácido en su región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor. Las modificaciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácidos.

Se ha mostrado que, a fin de obtener una variante polipeptídica que tenga una mayor unión a FcRn en comparación con su polipéptido progenitor, la al menos una modificación de aminoácido se debería introducir en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc, en comparación con dicho polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Aquí, el "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo de EU de IgG1 humana. Por ejemplo, las posiciones análogas para otras regiones Fc se pueden determinar a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos de las mencionadas regiones Fc con el fragmento de cadena pesada de IgG1 humana que comprende el polipéptido de SEQ ID NO:1. Para fines ilustrativos, la Fig. 6 representa el alineamiento de secuencias de fragmentos de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas que comprenden el dominio "bisagra inferior-CH2-CH3".

Por "al menos una modificación de aminoácido", como se usa aquí, se quiere decir "una o más modificaciones". Se considera que la introducción de más de 20 modificaciones de aminoácidos en la región Fc puede alterar drásticamente sus actividades biológicas. En consecuencia, la variante polipeptídica tiene preferiblemente de 1 a 20, y más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos, en las posiciones seleccionadas de la lista citada anteriormente. Por "1 a 20 modificaciones de aminoácidos", como se usa aquí, engloba 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 modificaciones de aminoácidos. La mencionada secuencia de la variante polipeptídica posee preferiblemente al menos alrededor de 90% de identidad con su secuencia polipeptídica progenitora.

5 Como se pretende aquí, un polipéptido determinado que tiene al menos alrededor de 90% de aminoácidos con un polipéptido de referencia posee al menos alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% de identidad de aminoácidos con dicho polipéptido de referencia.

10 Las variantes de Fc de la presente descripción que presentan la mayor afinidad de unión por FcRn comprenden generalmente más de una modificación de aminoácido. Los resultados obtenidos del ensayo ELISA de fagos descrito en el ejemplo II muestran que las variantes optimizadas que comprenden más de una modificación de aminoácido pueden tener una señal específica de alrededor de 3,2 veces a 30 veces más fuerte (véanse la tabla 2 y tabla 3) que el Fc de tipo salvaje, mientras que las variantes con una única modificación de aminoácido puntual (véase la tabla 1) puede tener una señal de alrededor de 1,2 veces a 3,5 veces más fuerte que el Fc de tipo salvaje. Como se ilustra en la tabla 3, la señal de la variante optimizada puede ser de alrededor de 1 vez a alrededor de 10 veces más fuerte que la de Fc-H, que se refiere a la variante de Fc que tiene la modificación doble de aminoácido T250Q/M428L.

15 En consecuencia, en una realización específica, la mencionada variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos seleccionadas de la lista que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 20 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

25 Como se describe en la tabla 5 de la presente solicitud, las variantes de Fc que presentan la mayor afinidad de unión por FcRn pueden tener 3 a 6 modificaciones de aminoácidos.

30 En consecuencia, en una realización adicional, los polipéptidos variantes de la descripción pueden comprender 3 a 6 modificaciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en los que la numeración de los aminoácidos 35 en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Las modificaciones de aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo de supresiones y sustituciones.

40 Algunas posiciones de aminoácidos de la lista anterior – a saber, 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434 – son posiciones clave. En otras palabras, las variantes de Fc que presentan elevada afinidad de unión por FcRn probablemente comprenden al menos una modificación de aminoácido en las mencionadas posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la variante polipeptídica según la descripción comprende al menos una modificación de aminoácido en las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434 de la región Fc en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

45 Entre las posiciones clave anteriores, la secuenciación de las variantes de Fc que presentan la unión más fuerte para FcRn ha mostrado que las posiciones de aminoácidos 230, 264, 307, 315, 330, 378 y 434 son las posiciones mutadas más a menudo. En consecuencia, en otra realización, la al menos una modificación se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en 230, 264, 307, 315, 330, 378 y 434, más preferiblemente del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434, de la región Fc en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la 50 numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Como se menciona anteriormente, la introducción de al menos dos modificaciones de aminoácidos puede potenciar notablemente la afinidad de unión de la variante Fc por FcRn, en comparación con el progenitor de Fc.

En consecuencia, en una realización alternativa, la variante polipeptídica comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:

55 (i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421, y 434; y

5 (ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447,

10 de la región Fc en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido como la modificación (ii).

Por ejemplo, según la mencionada condición, si la modificación de aminoácido (i) se produce en la posición 434, la al menos una modificación de aminoácido (ii) se puede producir en cualquier posición de la lista citada en (ii), excepto en la posición 434.

15 En otra realización, la variante polipeptídica comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:

(i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434; y

20 (ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447

25 de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización adicional, la mencionada variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:

30 (i) una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434; y

(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434

35 de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otra realización adicional, la mencionada variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, que comprenden:

(i) una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 378 y 434; y

40 (ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434

de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

45 En una realización alternativa, la variante polipeptídica comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos en su región Fc. En consecuencia, las mencionadas al menos tres modificaciones de aminoácidos pueden comprender:

(i) dos modificaciones en dos posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y

50 (ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370,

ES 2 726 625 T3

371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447

5 de la región Fc en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización alternativa, la variante polipeptídica comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos tres modificaciones de aminoácidos:

10 (i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434;

(ii) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y

15 (iii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447

20 de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i), la modificación (ii) y la modificación (iii) no se produzcan simultáneamente en las mismas posiciones de aminoácidos.

En otras realizaciones, la variante polipeptídica comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos tres modificaciones de aminoácidos:

25 (i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378 y 434;

(ii) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo de 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y

30 (iii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447

35 de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i), la modificación (ii) y la modificación (iii) no se produzcan simultáneamente en las mismas posiciones de aminoácidos.

En todas las realizaciones citadas previamente de la presente invención, las modificaciones de aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en sustituciones y supresiones de aminoácidos.

40 Un objeto adicional de la invención se refiere a una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido progenitor, y comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

ES 2 726 625 T3

En una realización alternativa, el mencionado polipéptido comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en el que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Preferiblemente, la mencionada variante tiene de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos seleccionadas de las listas anteriores, en comparación con el polipéptido progenitor. Como se usa aquí, por "de 1 a 20 modificaciones" se quiere decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 modificaciones.

En algunas realizaciones, la mencionada variante comprende de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En una realización alternativa, el mencionado polipéptido comprende de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226G, 227L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en el que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Algunas modificaciones de aminoácidos de las listas anteriores son modificaciones clave. En otras palabras, las variantes de Fc que presentan elevada afinidad de unión por FcRn probablemente comprenden al menos una modificación de aminoácido seleccionada de las mencionadas modificaciones clave.

En consecuencia, la mencionada variante polipeptídica puede comprender al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S de la región Fc, en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, la mencionada variante polipeptídica comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264E, 315D, 378V, 378T, 434Y y 434S de la región Fc, en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En una realización adicional, la mencionada variante polipeptídica comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378V, 378T, 434Y y 434S de la región Fc, en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Como se menciona anteriormente, la introducción de al menos dos modificaciones de aminoácidos puede potenciar notablemente la unión de las variantes de Fc a FcRn, en comparación con los progenitores. Al menos una de dichas modificaciones se puede seleccionar de las modificaciones clave, es decir, del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S.

En una realización alternativa, la mencionada variante polipeptídica comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo las mencionadas al menos dos modificaciones

(i) una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S; y

(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317,

ES 2 726 625 T3

320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447

- 5 de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización adicional, la mencionada variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo las mencionadas al menos dos modificaciones de aminoácidos

- 10 (i) una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434

de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

- 15 En otra realización, la mencionada variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo las mencionadas al menos dos modificaciones:

- (i) una modificación de aminoácido seleccionada e3 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada de 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S, y más preferiblemente, de 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S

- 20 de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que la modificación (i) no se produzca en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

- 25 En consecuencia, un objeto adicional de la invención se refiere a una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos en la región Fc como en la reivindicación 1.

- 30 La al menos una combinación de modificaciones se selecciona del grupo que consiste en: 226G/330V, 230L/264E, 230L/378V, 230S/315D, 230S/434Y, 230T/378V, 241L/434S, 250A/434Y, 264E/378T, 305A/315D, 305A/330V, 305A/434Y, 307P/434Y, 315D/389T, 330V/382V, 330V/389T, 378V/421T, 389K/434Y, 389T/434Y, 396L/434S, 230T/264E, 230T/315D, 230T/434S, 230T/434Y, 241L/307P, 264E/307P, 264E/396L, 315D/362R, 315D/382V, 362R/434Y, 378V/434Y, 382V/434Y, 226G/315D, 226G/434Y, 241L/378V, 307P/378V, 241L/264E, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, 330V/434Y y 315D/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

- 40 La mencionada variante puede comprender además al menos una modificación seleccionada del grupo de 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

- 50 En otra realización, una variante según la presente descripción comprende:

- (i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
226G/330V, 230L/264E, 230L/378V, 230S/315D, 230S/434Y, 230T/378V, 241L/434S, 250A/434Y, 264E/378T, 305A/315D, 305A/330V, 305A/434Y, 307P/434Y, 315D/389T, 330V/382V, 330V/389T, 378V/421T, 389K/434Y, 389T/434Y, 396L/434S, 230T/264E, 230T/315D, 230T/434S, 230T/434Y, 241L/307P,

264E/307P, 264E/396L, 315D/362R, 315D/382V, 362R/434Y, 378V/434Y, 382V/434Y, 226G/315D, 226G/434Y, 241L/378V, 307P/378V, 241L/264E, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, 330V/434Y, y 315D/434Y; y

- 5 (ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R

10 de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que las modificaciones (i) no se produzcan en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

15 En otras realizaciones, la mencionada variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 250A/434Y, 307P/434Y, 230T/434S, 264E/396L, 378V/434Y, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, y 315D/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

20 La mencionada variante puede comprender además al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo de 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante según la presente descripción comprende:

- 30 (i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

250A/434Y, 307P/434Y, 230T/434S, 264E/396L, 378V/434Y, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, y 315D/434Y; y

- 35 (ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R

40 de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que las modificaciones (i) no se produzcan en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En algunas realizaciones, la mencionada variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

45 226G/315D/330V, 226G/315D/434Y, 226G/330V/434Y, 230L/264E/378V, 230T/264E/378V, 230T/264E/434S, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/389T/434S, 241L/264E/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/307P, 241L/307P/378V, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 294del/307P/434Y, 264E/307P/378V, 264E/396L/434S, 264E/378V/434S, 305A/315D/330V, 305A/315D/434Y, 305A/330V/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/382V, 315D/330V/389T, 315D/378V/434Y, 315D/389T/434Y, 315D/362R/434Y, 315D/382V/434Y, 315D/330V/434Y, 330V/382V/434Y, 330V/389T/434Y, y 378V/383N/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

50 La mencionada variante puede comprender al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D,

ES 2 726 625 T3

375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante según la presente descripción comprende:

(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

226G/315D/330V, 226G/315D/434Y, 226G/330V/434Y, 230L/264E/378V, 230T/264E/378V, 230T/264E/434S, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/389T/434S, 241L/264E/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/307P, 241L/307P/378V, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 294del/307P/434Y, 264E/307P/378V, 264E/396L/434S, 264E/378V/434S, 305A/315D/330V, 305A/315D/434Y, 305A/330V/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/382V, 315D/330V/389T, 315D/389T/434Y, 315D/362R/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y, 315D/330V/434Y, 330V/382V/434Y, 330V/389T/434Y, y 378V/383N/434Y; y

(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R

de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que las modificaciones (i) no se produzcan en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otras realizaciones, la mencionada variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/264E/434S, 230T/389T/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/434S, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 264E/378V/434S, 264E/396L/434S, 294del/307P/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

La mencionada variante puede comprender además al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante según la presente descripción comprende:

(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/264E/434S, 230T/389T/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/434S, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 264E/378V/434S, 264E/396L/434S, 294del/307P/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y; y

(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R

de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat, y con la condición de que las modificaciones (i) no se produzcan en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

5 En todas las realizaciones previamente citadas, la mencionada variante tiene preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido progenitor.

En una realización alternativa, la mencionada variante comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 307A/315D/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 256N/378V/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 315D/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 294del/307P/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 3081/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y 230T/303A/322R/389T/404L/434S de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

10

15

20

En otra realización, la mencionada variante comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 256N/378V/434Y, 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y y 230S/315D/428L/434Y.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar variantes polipeptídicas con mayor unión para FcRn en comparación con sus polipéptidos progenitores, y que comprenden una variante de Fc seleccionada del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 307A/315D/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 315D/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 256N/378V/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 315D/330V/362R/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 3081/315D/330V/382V/434Y, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y y 230S/315D/387T/434Y, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. En algunas otras realizaciones, la variante polipeptídica con mayor unión para FcRn en comparación con su polipéptido progenitor comprende una variante de Fc seleccionada del grupo que consiste en 256N/378V/434Y, 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y y 230S/315D/428L/434Y.

25

30

35

Para todas las variantes mencionadas anteriormente según la invención, la región Fc de sus polipéptidos progenitores puede derivar de las regiones Fc de las IgG de tipo salvaje (por ejemplo "bisagra inferior-CH2-CH3") y sus fragmentos. En una realización más preferida, la región Fc de los polipéptidos progenitores deriva de las subclases de IgG humana, a saber, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización preferida, la región Fc de los polipéptidos progenitores se selecciona del grupo que consiste en la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (SEQ ID NO:1), la región Fc de IgG2 de tipo salvaje (SEQ ID NO:2), la región Fc de IgG3 de tipo salvaje (SEQ ID NO:3), y la región Fc de IgG4 de tipo salvaje (SEQ ID NO:4).

40

En este contexto, otro objeto de la invención es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG1, en el que dicha variante de Fc de IgG1 comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG1 (SEQ ID NO:1), y presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el Fc de IgG1 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG1 no sea SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

45

Otro objeto de la invención es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG2, en el que dicha variante de Fc de IgG2 comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG2 (SEQ ID NO:2), y presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el Fc de IgG2 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG2 no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

50

Un objeto adicional de la invención es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG3, en el que dicha variante de Fc de IgG3 comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG3 (SEQ ID NO:3), y presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el Fc de IgG3 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG3 no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4.

55

Otro objeto de la invención es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG4, en el que dicha variante de Fc de IgG4 comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG4 (SEQ ID NO:4), y presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el Fc de IgG4 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG2 no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:2.

En realizaciones preferidas, la al menos una modificación de aminoácido comprendida en los polipéptidos variantes de Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se seleccionan del grupo de modificaciones de aminoácidos y combinaciones de modificaciones de aminoácidos que se describen anteriormente en la presente memoria descriptiva cuando definen generalmente la variante de un polipéptido que comprende una región Fc y que tiene una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor correspondiente.

Como se describe anteriormente, una variante según la invención presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor correspondiente. En una realización, las funciones efectoras y las otras propiedades de unión de la mencionada variante son similares a las del progenitor correspondiente. La mencionada variante puede presentar particularmente ningún cambio significativo en la unión a receptores Fc-gamma o C1q, en comparación con su polipéptido progenitor.

En otra realización, la mencionada variante tiene una mayor unión a FcRn combinada con una o más funciones efectoras alteradas y/o unión a ligandos de Fc (distintos de FcRn).

Como se ilustra en el Ejemplo 2, la variante de la invención puede tener una mayor unión a FcRn combinada con una unión inalterada a FcγR, en particular a FcγRIIIa, actividad ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y actividad CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), en comparación con la variante polipeptídica. La variante de la invención también puede tener una mayor unión a FcRn combinada con actividades de ADCC y CDC que son al menos similares a las de su progenitor polipeptídico. En algunos otros casos, la variante de la invención puede tener una mayor unión a FcRn combinada con al menos una actividad efectora reducida seleccionada de ADCC y CDC, en comparación con su progenitor polipeptídico.

Las actividades de ADCC y CDC se pueden evaluar mediante métodos bien conocidos de la técnica anterior, tales como los descritos en el Ejemplo 2, partes IV.2 y IV.3, de la presente memoria descriptiva.

La unión a FcγR se puede evaluar mediante métodos convencionales, tal como ensayo de SPR o ELISA.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar variantes que comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos adicionales que difieren de las citadas previamente, con la condición de que las variantes resultantes tengan una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor.

En consecuencia, las modificaciones de Fc de la presente invención se pueden combinar con otras modificaciones de Fc que se sabe que incrementan la afinidad de Fc por FcRn (véanse, por ejemplo, las referencias citadas en la parte de la presente solicitud dedicada a la descripción de la técnica relacionada).

Como alternativa, las modificaciones de Fc se pueden combinar con otras modificaciones de Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora o la interacción con uno o más ligandos de Fc. Como consecuencia, tales variantes pueden presentar una mayor unión a FcRn combinada con una unión alterada a un ligando de Fc (distinto de FcRn) o/y una función efectora alterada, en comparación con el polipéptido progenitor.

Los ligandos de Fc incluyen, pero no se limitan a, los FcγR (receptores de Fc gamma), C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, y los FcγR víricos. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos de receptores Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los Fc gamma R (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136).

Por "función efectora", como se usa aquí, se quiere decir un suceso bioquímico o celular que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos), ADCP (fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos), y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento).

Las variantes de la presente descripción engloban cualquier polipéptido que comprende una región Fc y que presenta una mayor afinidad de unión por FcRn en comparación con su polipéptido progenitor, con la condición de que el mencionado polipéptido difiera de su polipéptido progenitor en virtud de al menos una modificación de aminoácido o combinación de modificaciones de aminoácidos en la región Fc. Las modificaciones y las combinaciones de modificaciones de aminoácidos de interés son las descritas anteriormente cuando se dan características generales de las variantes según la invención.

Como se define mediante las reivindicaciones anejas, las variantes (y de este modo, los polipéptidos progenitores) incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, proteínas de fusión de Fc, conjugados de Fc, Fc aislado y sus fragmentos, respectivamente. En particular, las variantes pueden ser una proteína de unión que comprende Fc. En

otras palabras, las variantes que comprenden (i) una variante de Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión que es capaz de unirse específicamente a una molécula dada.

5 En una realización, las variantes polipeptídicas de la invención se seleccionan del grupo que consiste en variantes de proteínas de fusión de Fc y variantes de conjugados de Fc. La proteína de fusión de Fc y los conjugados de Fc consisten en una región Fc enlazada a una pareja. La región Fc puede estar enlazada a su pareja, con o sin un espaciador.

10 Según la presente invención, una proteína de fusión de Fc es una proteína codificada por un único gen, y comprende una proteína, un polipéptido o un pequeño péptido enlazado a una región Fc. Una proteína de fusión de Fc comprende opcionalmente un espaciador peptídico. Virtualmente, cualquier proteína o pequeña molécula se puede enlazar a regiones Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de cualquier anticuerpo, un polipéptido derivado de una región variable de cualquier anticuerpo, la región de un receptor que se une a una diana, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina, o alguna otra proteína o dominio proteico. En particular, la proteína de fusión de Fc puede ser una inmunoadhesina, es decir, una proteína similar a un anticuerpo que combina el dominio de unión de una proteína de "adhesión" heteróloga (es decir, receptor, ligando, o enzima) con un fragmento de dominio constante inmunoglobulínico (es decir, una región Fc) (para un repaso sobre inmunoadhesinas, véase Ashkenazi A, Chamow SM. 1997, Curr Opin Immunol.; 9(2):195-200).

20 Las parejas de fusión de pequeños péptidos pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc hacia una diana terapéutica. Tales dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular que esté implicado en una enfermedad.

25 Según la presente invención, un conjugado de Fc resulta del acoplamiento químico de una región Fc con una pareja del conjugado. La pareja del conjugado puede ser proteinosa o no proteinosa. La reacción de acoplamiento usa generalmente grupos funcionales en la región Fc y en la pareja del conjugado. En la técnica se conocen diversos enlazadores que son apropiados para la síntesis del conjugado; por ejemplo, los enlazadores homo- o heterobifuncionales son bien conocidos (véase el catálogo de Pierce Chemical Company, 2005-2006, sección técnica sobre reticuladores, páginas 321-350).

30 Las parejas del conjugado adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos terapéuticos, marcadores (para ejemplos de marcadores, véase más abajo), fármacos, agentes citotóxicos, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), toxinas, y fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen, pero no se limitan a, cadena A de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, y similares. Un agente citotóxico puede ser cualquier radionúclido que se puede conjugar directamente a la variante de Fc o que puede ser secuestrado por un agente quelante que está unido covalentemente a la variante de Fc. En realizaciones adicionales, las parejas del conjugado se pueden seleccionar del grupo que consiste en caliqueamicina, auristatinas, geldanamycin, maitansina, y duocarmicinas y análogos (para estos últimos, véase el documento U.S. 200310050331).

35 Tales variantes de interés pueden tener una mayor unión a FcRn a pH reducido (por ejemplo, a alrededor de pH 6), y una unión sustancialmente no modificada a mayor pH (por ejemplo, a alrededor de pH 7,4). Son de particular interés las variantes de proteína de fusión de Fc y de conjugado de Fc que presentan mayores semividas in vivo en comparación con los polipéptidos progenitores.

40 En una realización preferida, la variante polipeptídica de la presente invención es un anticuerpo variante de un anticuerpo progenitor. El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio. Según la presente invención, "anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al menos (i) una región Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. El mencionado dominio polipeptídico de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana dado, o a un grupo de antígenos diana. Un dominio polipeptídico de unión que deriva de una región variable de una inmunoglobulina comprende al menos una o más CDR. Aquí, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multispecíficos, proteína de fusión de Fc que comprende al menos una región variable, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados aquí como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos totalmente humanos. Los anticuerpos también engloban proteínas de fusión de anticuerpos, conjugados de anticuerpos, y fragmentos de cada uno, respectivamente. En consecuencia, un anticuerpo variante de la invención comprende, en su región Fc, al menos una modificación de aminoácido o combinación de modificaciones citadas anteriormente que incrementan su afinidad de unión por FcRn en comparación con su anticuerpo progenitor. Son de particular interés las variantes de anticuerpos que presentan una mayor afinidad de unión por FcRn a menor pH (por ejemplo a alrededor de pH 6), y que tienen una unión sustancialmente no modificada a mayor pH (por ejemplo a alrededor de pH 7,4). Además, son de particular interés las variantes de anticuerpos que tienen mayores semividas in vivo en comparación con los polipéptidos progenitores.

En una realización, un anticuerpo variante de la invención se selecciona del grupo que consiste en variantes de anticuerpos progenitores de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" se quiere decir aquí la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. El

- 5 polipéptido progenitor de una variante de anticuerpo de longitud completa de la presente invención puede ser un anticuerpo de tipo salvaje, un mutante de un anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo que comprende modificaciones preexistentes), una versión manipulada mediante ingeniería de un anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo totalmente humano; véase más abajo), no siendo esta lista limitante. La estructura de un anticuerpo de longitud completa es generalmente un tetrámero, excepto para algunos mamíferos tales como llamas y camellos, en los que algunas inmunoglobulinas son dímeros. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa).
- 10 Los ejemplos de anticuerpos de longitud completa son inmunoglobulinas humanas que engloban las clases IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.
- En realizaciones preferidas, la mencionada variante de anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo que consiste en variantes de las IgG.
- 15 En realizaciones más preferidas, la mencionada variante de anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo que consiste en variantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, con la condición de que la mencionada secuencia de la región Fc de dicha variante no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.
- 20 La mencionada variante de IgG comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con su IgG progenitora; dicha una o más modificaciones o combinaciones de modificaciones de aminoácidos son las descritas previamente en la presente memoria descriptiva cuando se definen en general las variantes de un polipéptido que comprende una región Fc y que tiene una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido progenitor correspondiente.
- 25 En otra realización, la mencionada variante de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una proteína de fusión de Fc que comprende un dominio polipeptídico de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. Son de particular interés los anticuerpos que comprenden (a) una variante de Fc de la invención, y (b) uno de los siguientes dominios polipeptídicos de unión derivados de una región variable de una inmunoglobulina (es decir, que comprende al menos una CDR): (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) regiones de CDR aisladas, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados, (vi) moléculas de Fv monocatenario (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están enlazados mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (vii) Fv monocatenario biespecífico, y (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica, no siendo esta lista limitante.
- 30 En otra realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas, que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061). En algunos casos, el scFv se puede unir a una región Fc de longitud completa (De Lorenzo et al., 2005, Carcinogenesis 26:1890-1895), y también puede incluir la región bisagra o su fragmento.
- 35 En una realización, los anticuerpos de la invención se seleccionan del grupo de anticuerpos multiespecíficos, y principalmente del grupo de anticuerpos biespecíficos, que algunas veces se denominan como "diacuerpos". Estos anticuerpos se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos se pueden fabricar de muchas maneras conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449), por ejemplo preparados químicamente o derivados a partir de hibridomas.
- 40 En algunas realizaciones, los componentes del armazón de las variantes de anticuerpos pueden ser una mezcla de diferentes especies. Tal variante de anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones procedentes de más de una especie. Por ejemplo, "anticuerpos quiméricos" comprende tradicionalmente una región o regiones variables de un animal no humano, generalmente el ratón (o rata, en algunos casos), y la región o regiones constantes de un ser humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDR, es codificado por un polinucleótido de origen humano, o es idéntico a un anticuerpo humano excepto en sus CDR. Las CDR, algunas de las cuales, o todas, están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en la estructura de lámina beta de la región variable del anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018; Jones, 1986, Nature 321:522-525; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. Este anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y de este modo comprenderá típicamente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar usando ratones con un sistema inmune genéticamente manipulado mediante ingeniería (Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654). En la técnica se conoce una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos (véase Tsurushita y Vasquez,
- 55

- 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y las referencias citadas allí). Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9; Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de remodelación de la superficie, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973.
- 5
- 10 En una realización, la mencionada variante de anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano con al menos una modificación de aminoácido como se resume aquí. "Anticuerpo totalmente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo que comprende en su totalidad secuencias que se originan a partir de genes humanos. En algunos casos, éste puede ser anticuerpos humanos que tienen la secuencia génica de un anticuerpo derivada de un cromosoma humano con las modificaciones resumidas aquí. Como alternativa, los componentes del anticuerpo pueden ser humanos, pero pueden no derivar de un único gen. De este modo, por ejemplo, las CDR humanas procedentes de un anticuerpo se pueden combinar con secuencias, tales como secuencias de armazón, procedentes de uno o más anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede combinar una variedad de secuencias de línea germinal para formar un anticuerpo humano o armazón humano (por ejemplo, para uso en secuencias humanizadas o quiméricas como se resume anteriormente), así como la solicitud de patente U.S. nº 11/022.289.
- 15
- 20 En ciertas realizaciones, la variante de anticuerpo de la invención se selecciona del grupo que consiste en IgG quiméricas, IgG humanizadas, e IgG totalmente humanas.
- También están incluidas dentro del alcance de esta invención las modificaciones covalentes de anticuerpos, y generalmente se realizan, pero no siempre, de modo post-traducciona. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glicosilaciones, marcaje, y conjugación.
- 25
- 30 En consecuencia, en algunas realizaciones, las variantes polipeptídicas descritas aquí se pueden modificar para incluir una o más glicofomas manipuladas mediante ingeniería. Por "glicofoma manipulada mediante ingeniería", como se usa aquí, se quiere decir una composición de hidrato de carbono que está unida covalentemente al polipéptido que comprende la variante de Fc, en la que dicha composición de hidrato de carbono difiere químicamente de la de un progenitor polipeptídico. Las glicofomas manipuladas mediante ingeniería pueden ser útiles para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitarse a, potenciación o reducción de la función efectora. Las glicofomas manipuladas mediante ingeniería se pueden unir a cualquier aminoácido de la secuencia variante. En una realización preferida, las mencionadas glicofomas se unen a aminoácidos de la región Fc.
- 35
- 40 Las glicofomas manipuladas mediante ingeniería se pueden generar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; patente U.S. nº 6.602.684; U.S. Series nºs 10/277.370; 10/113.929; documentos WO 00/61739A1; WO 01/29246A1; WO 02/31140A1; WO 02/30954A1, WO 01/77181; (Potelligent® technology [Biowa, Inc., Princeton, N.J.]; GlycoMAb® glycosylation engineering technology [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en el control del nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecantes que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo expresando la variante de anticuerpo en diversos organismos o estirpes celulares, manipulados mediante ingeniería o de otro modo (por ejemplo células Lec-13 CHO o células YB2/0 de hibridoma de rata), regulando enzimas implicadas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando el hidrato o hidratos de carbono después de que se ha expresado la variante de anticuerpo.
- 45
- 50 Como alternativa, la glicofoma manipulada mediante ingeniería se puede referir a la variante de anticuerpo que comprende el hidrato de carbono u oligosacárido diferente. Como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de restos de aminoácidos de glicosilación particulares, explicado más abajo), o de la célula hospedante u organismo en el que se produce la proteína. Más abajo se explican sistemas de expresión particulares.
- 55
- La glicosilación de polipéptidos está típicamente enlazada mediante N o enlazada mediante O. Enlazada mediante N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral del resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada mediante O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa, a un hidroxiaminoácido, muy habitualmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de

- glicosilación enlazados mediante N). La alteración también se puede realizar mediante adición, o sustitución, de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación enlazados mediante O). Para facilidad, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas, de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.
- Otro medio de incrementar el número de restos de hidratos de carbono en el anticuerpo es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos por cuanto no requieren la producción de la proteína en una célula hospedante que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada mediante N y mediante O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, p. 259-306.
- La eliminación de los restos de hidratos de carbono presentes en el anticuerpo de partida se puede lograr química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja el péptido intacto. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y por Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas, como se describe por Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. La glicosilación en los sitios de glicosilación potenciales se puede evitar mediante el uso del compuesto tunicamicina, como se describe por Duskin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces N-glicosídicos de la proteína.
- En algunas realizaciones, la variante de anticuerpo de la invención se selecciona del grupo que consiste en IgG quiméricas, IgG humanizadas e IgG totalmente humanas, que comprenden glicofomas manipuladas mediante ingeniería.
- En una realización alternativa, la modificación covalente de las variantes de anticuerpo de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. En algunos casos, estas se consideran fusiones de anticuerpos. La expresión "grupo marcador" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador se acopla al anticuerpo vía brazos espaciadores de diversas longitudes, para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen diversos métodos para marcar proteínas, y se pueden usar para llevar a cabo la presente invención.
- En general, los marcadores caen dentro de una variedad de clases, dependiendo del ensayo o del procedimiento de diagnóstico en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas, etc.).
- Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos, incluyendo, pero sin limitarse a, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo estos últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser "pequeñas moléculas" fluorescentes, o proteínas fluorescentes.
- En otra realización, las variantes de anticuerpo de la presente invención se pueden fusionar o conjugar a una proteína o a una pequeña molécula que no se usan como grupo marcador como se describe anteriormente. Virtualmente, cualquier proteína o pequeña molécula se puede enlazar a un anticuerpo. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región de un receptor de unión a la diana, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina, o alguna otra proteína o dominio proteico. Las pequeñas moléculas incluyen, pero no se limitan a, fármacos, agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), toxinas, o fragmentos activos de tales toxinas.
- Como se describe anteriormente, las variantes de anticuerpo de la invención son capaces de unirse específicamente a un antígeno diana o a un grupo de antígenos diana. Por "antígeno diana", como se usa aquí, se quiere decir la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo o inmunoglobulina dados. Un antígeno diana puede ser una proteína, un hidrato de carbono, un lípido, u otro compuesto químico.
- La elección del antígeno adecuado depende de la aplicación deseada. Virtualmente, cualquier antígeno se puede seleccionar como diana, por ejemplo proteínas de membrana que comprenden, pero no se limitan a, el antígeno RhD, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD32B, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD71 (receptor de transferrina), CD80, CD86, CTLA-4, CD147, CD160, CD224, receptores de factores de crecimiento como aquellos

que pertenecen a la familia de ErbB de receptores ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 (EGFR, HER2/neu, HER3, HER4), VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-R1, PIGF-R, moléculas de MHC clase I y MHC clase II, por ejemplo HLA-DR, receptores de interleucinas como IL-1R, IL-2R alfa, IL-2R beta e IL-2R gamma, IL-6R, receptores de hormonas como el receptor de la sustancia inhibidora de Müllerian tipo II, el receptor de LDL, NKp44L, receptores de quimiocinas como CXCR4 y CCR5, integrinas, moléculas de adhesión como CD2, ICAM, EpCAM. Las proteínas de membrana también incluyen marcadores tumorales como GD2, GD3, CA125, MUC-1, MUC-16, antígeno carcinoembrionario (CEA), Tn, glicoproteína 72, PSMA, HMW-MAA. Los anticuerpos de la invención también pueden seleccionar como dianas a proteínas solubles, incluyendo, pero sin limitarse a, citocinas (por ejemplo IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, IL-23, TGF beta, TNF alfa, IFN gamma), quimiocinas, factores de crecimiento como VEGF-A, EGF, PIGF, PDGF, IGF, hormonas, toxinas bacterianas y toxinas de otro origen, como la toxina botulínica, ricina, antígeno protector de B. anthracis, factor letal de B. anthracis, factor de edema de B. anthracis, shigatoxinas 1 y 2, antígenos víricos procedentes de virus diferentes, por ejemplo virus patógenos, un anticuerpo inhibidor, incluyendo un anticuerpo inhibidor de FVIII.

En una realización preferida, la variante de la presente invención puede seleccionar como diana a CD20. En este caso, el polipéptido progenitor se puede seleccionar de: EMAB6 o EMAB603 (véase el documento WO2006064121), RITUXIMAB (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.736.137), HUMAX®-CD20, descrito en la patente U.S. nº 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (documento PCT/US2003/040426, titulado "Variantes Inmunoglobulínicas y Sus Usos").

En otra realización, la variante de la presente invención puede seleccionar como diana al antígeno RhD. En este caso, el polipéptido progenitor se puede seleccionar de EMAB2 (véase el documento FR 0312229), Sym001 (Symphogen A/S) o MonoRho (ZLB, Zurich).

El polipéptido progenitor puede ser también Avastin® (anti-VEGF), Remicade® (anti-TNF- α), Erbitux®, Vectibix® (anti-EGFR), Tysabri® (anti-cadena alfa4 de integrina), Herceptin® (anti-HER2/neu), no siendo la lista limitante.

La presente solicitud también proporciona variantes que presentan una mayor unión a FcRn en combinación con otra propiedad optimizada seleccionada de una variedad de propiedades terapéuticamente relevantes bien conocidas. La propiedad más preferida que se puede optimizar es la semivida in vivo. Para presentar una mayor semivida in vivo, la variante debería presentar una mayor afinidad de unión por FcRn a menor pH, tal como el pH asociado con los endosomas, por ejemplo pH 6,0, mientras mantiene la afinidad reducida a mayor pH, tal como 7,4, para permitir una mayor unión a FcRn en los endosomas pero velocidades de liberación normales (Dall'Acqua et al., 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180; Gurbaxani et al., 2006, Mol Immunol. 43(9):1462-73). De forma similar, estas variantes con tal unión a FcRn modulada pueden tener opcionalmente otras propiedades deseables, tal como una unión a Fc γ R modulada. En una realización adicional, las variantes se optimizan para poseer mejor afinidad por un Fc γ R activante humano, preferiblemente Fc γ RIIIa, además del perfil de unión a FcRn. En una realización alternativa, las variantes se optimizan para tener una mayor afinidad por FcRn y mayor o menor afinidad por un Fc γ R humano, incluyendo, pero sin limitarse a, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, y Fc γ RIIIb, incluyendo sus variaciones alélicas. En realizaciones alternativas, las variantes de la presente invención pueden tener opcionalmente mayores (o menores) funciones efectoras, así como una mayor semivida en suero. En realizaciones particularmente preferidas, una variante de la invención puede tener una mayor actividad de ADCC y/o mayor unión a un Fc γ R, así como una mayor semivida en suero, en comparación con su progenitor polipeptídico. En otras realizaciones, la variante de la invención puede tener además una mayor actividad de CDC en comparación con su progenitor polipeptídico.

Las variantes pueden encontrar uso en un amplio intervalo de productos. En una realización, la variante es un reactivo terapéutico, un reactivo de diagnóstico, o un reactivo de investigación, preferiblemente un reactivo terapéutico.

Puesto que presenta una mayor unión a FcRn, se anticipa que la variante de la invención tiene semividas in vivo más prolongadas, de forma más precisa, semividas séricas in vivo más prolongadas que sus polipéptidos progenitores. Como consecuencia, tales variantes tienen aplicaciones útiles como sustitutos de polipéptidos progenitores cuando el polipéptido progenitor se aclara demasiado rápidamente de la circulación sanguínea, o para uso en el tratamiento de enfermedades crónicas o a largo plazo, que requieren principios activos con semividas prolongadas.

Cuando las variantes se seleccionan del grupo de anticuerpos, pueden encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, las mencionadas variantes de anticuerpos se usan para exterminar células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una realización alternativa, las variantes se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo para antagonizar una citocina o receptor de citocina, para neutralizar un agente infeccioso como una bacteria o un virus o una toxina, por ejemplo una toxina bacteriana. En una realización alternativamente preferida, las variantes se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y exterminar las células diana que portan el antígeno diana.

En una realización preferida, un anticuerpo variante se administra a un paciente para tratar un trastorno relacionado con anticuerpos. Para los fines de la presente invención, un "paciente" incluye seres humanos y otros animales, preferiblemente mamíferos, y muy preferiblemente, seres humanos. por "trastorno relacionado con anticuerpos" o "trastorno sensible a anticuerpos" o "afección" o "enfermedad" se quiere decir aquí un trastorno que se puede mejorar mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una variante de la presente invención. Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, dolor, enfermedades pulmonares, afecciones hematológicas, afecciones fibróticas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas que incluyen cáncer. Por "cáncer" y "canceroso" se hace referencia aquí o se describe el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia y neoplasias linfoides. Otras afecciones que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Sjorgren, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, asma, alergias y afecciones alérgicas, enfermedad de injerto frente a hospedante, y similares.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden la mencionada variante. Las mencionadas formulaciones se preparan mezclando la variante polipeptídica que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables o farmacéuticamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980). Tales composiciones farmacéuticas se destinan a tratar un paciente que lo necesita.

A fin de tratar un paciente que lo necesita, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la variante. Por "dosis terapéuticamente eficaz" se quiere decir aquí una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y será averiguable por alguien experto en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosis pueden oscilar de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,1, 1,0, 10, o 50 mg/kg de peso corporal, prefiriéndose 1 a 10 mg/kg. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de proteínas, el suministro sistémico frente al localizado, y la velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción farmacéutica, y la gravedad del estado, y se averiguarán con experimentación habitual por los expertos en la técnica.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante puede hacerse de muchas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, parenteralmente, intranasalmente, intraaórticamente, intraocularmente, rectalmente, vaginalmente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo, geles, ungüentos, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonariamente.

La sustancia terapéutica descrita aquí se puede administrar con otras sustancias terapéuticas concomitantemente, es decir, las sustancias terapéuticas descritas aquí se pueden coadministrar con otras terapias o sustancias terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, pequeñas moléculas, otras sustancias biológicas, terapia de radiación, cirugía, etc.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar ácidos nucleicos aislados que codifican variantes según la invención. Muy a menudo, el ADN que codifica el polipéptido progenitor está disponible o se puede obtener. En consecuencia, el ADN que codifica la variante de interés se puede generar alterando el ADN que codifica al polipéptido progenitor, gracias a una variedad de métodos conocidos en la técnica anterior. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis al azar, mutagénesis mediante PCR, y mutagénesis de casete. Las sustituciones de aminoácidos se realizan preferiblemente mediante mutagénesis dirigida al sitio (véanse, por ejemplo, Zoller y Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488).

Como alternativa, o adicionalmente, la secuencia de aminoácidos deseada que codifica una variante polipeptídica se puede determinar, y de este modo se puede generar sintéticamente mediante métodos bien conocidos de la técnica anterior.

Una vez que se obtienen sus ácidos nucleicos codificantes, las variantes de la presente invención se pueden obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, las secuencias variantes (por ejemplo, secuencias variantes de IgG) se usan para crear ácidos nucleicos que codifican las secuencias de los miembros, y que entonces se pueden clonar en células hospedantes, expresar y evaluar, si se desea. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos, y en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) se describe una variedad de métodos que pueden encontrar uso. Los ácidos nucleicos que codifican las variantes se pueden incorporar en un vector de expresión a fin de expresar la proteína. Los vectores de expresión incluyen típicamente una proteína enlazada operablemente, es decir, colocada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualesquiera parejas de fusión, y/o elementos adicionales. La variante (por ejemplo, variantes de IgG) de la presente invención se puede producir cultivando una

célula hospedante transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica la variante, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Se puede usar una amplia variedad de estirpes celulares hospedantes apropiadas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamíferos, bacterias, células de insectos, y levaduras. Por ejemplo, una variedad de estirpes celulares de mamíferos que pueden encontrar uso se describe en el catálogo de estirpes celulares de ATCC, disponible de la American Type Culture Collection. Las células hospedantes pueden ser, pero no se limitan a, YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.GII.IGAg.20, depósito en la American Type Culture Collection, ATCC n° CRL-1662), SP2/0, YE2/0, 1R983F, Namalwa, PERC6, estirpes celulares de CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec3, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, KGH6, NSO, SP2/0-Ag 14, P3X63Ag8.653, C127, JC, LA7, ZR-45-30, hTERT, NM2C5, UACC-812, y similares. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células hospedantes son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula hospedante usada. En una realización preferida de la invención, la variante se expresa en célula YB2/0, y es un anticuerpo anti-CD20, o un anticuerpo anti-RhD.

Además, una variante según la presente invención se puede producir mediante un animal no humano transgénico o una planta transgénica. También, un animal no humano transgénico se puede obtener inyectando directamente un gen deseado en un óvulo fertilizado (Gordon et al., 1980 Proc Natl Acad Sci USA.; 77:7380-4). Los animales no humanos transgénicos incluyen ratón, conejo, rata, cabra, vaca, ganado o aves de corral, y similares. Un animal no humano transgénico que tiene un gen deseado se puede obtener introduciendo el gen deseado en una célula madre embrionaria, y preparando el animal mediante un método de quimera de agregación o un método de quimera de inyección (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)). Los ejemplos de la célula madre embrionaria incluyen células madre embrionarias de ratón (Evans y Kaufman, 1981, Nature; 292:154-156), rata, cabra, conejo, mono, aves de corral, ganado, y similares. Además, un animal no humano transgénico también se puede preparar usando una técnica clonal en la que un núcleo, en el que se introduce un gen deseado, se transplanta a un óvulo enucleado (Ryan et al., 1997 Science; 278: 873 - 876; Cibelli et al., 1998 Science, 280: 1256-1258). La variante polipeptídica se puede producir introduciendo ADN que codifica la molécula variante en un animal preparado mediante el método anterior, para formar y acumular de ese modo la molécula variante en el animal, y recolectando entonces la variante polipeptídica del animal. La variante polipeptídica se puede obtener para que se forme y se acumule en la leche, huevo o similar del animal.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para identificar variantes de Fc que son variantes optimizadas, es decir, que tienen una mayor unión para un ligando de Fc, en comparación con la región Fc de tipo salvaje correspondiente. Dicho método comprende las etapas de:

- (i) generar una biblioteca de ácidos nucleicos que consiste en un conjunto de ácidos nucleicos que codifican variantes de Fc
- (ii) producir las variantes de Fc mediante la expresión de los ácidos nucleicos comprendidos en la mencionada biblioteca
- (iii) seleccionar, entre las variantes de Fc producidas en la etapa (ii), aquellas que son capaces de unirse al ligando de Fc
- (iv) medir la propiedad de unión de las variantes de Fc seleccionadas en la etapa (iii) y la de un control de Fc para el ligando de Fc, y
- (v) seleccionar las variantes de Fc que presentan una mayor unión para el ligando de Fc en comparación con el mencionado control de Fc

Las secuencias de ácidos nucleicos comprendidas en la mencionada biblioteca de ácidos nucleicos pueden ser ARN o ADN. En una realización preferida, la mencionada biblioteca comprende secuencias de ADN que codifican variantes de Fc.

El control de Fc se selecciona del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje y variantes de Fc conocidas que tienen propiedad de unión por el ligando de Fc igual o mayor que la de Fc de tipo salvaje.

El ligando de Fc se puede seleccionar de FcRn y receptores Fc.gamma., no siendo la lista limitante.

En una realización, los ácidos nucleicos de la biblioteca que codifican variantes de Fc se pueden generar alterando la secuencia de ADN que codifica el Fc de tipo salvaje. Como se usa aquí, por "alterar la secuencia de ácidos nucleicos" se quiere decir la introducción de mutaciones, tales como inserciones, supresiones o sustituciones de nucleótidos, en una secuencia de ácido nucleico dada. Tales mutaciones se pueden realizar mediante métodos bien conocidos de la técnica anterior. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis mediante PCR, y mutagénesis de casete.

En una realización preferida, la biblioteca se genera mediante mutagénesis al azar en base al uso de una o más ADN polimerasas de baja fidelidad. Tal mutagénesis al azar se describe en la solicitud PCT WO0238756. En

consecuencia, la biblioteca se puede generar mezclando sub-bibliotecas generadas con una única polimerasa o una combinación específica de polimerasas, como se describe en la parte de Materiales y Métodos del ejemplo de la presente solicitud.

5 En otra realización, la mencionada biblioteca de ácidos nucleicos se genera alterando las secuencias de ADN que codifican un conjunto de variantes de Fc optimizadas previamente, usando uno de los métodos mencionados anteriormente. Preferiblemente, se usa mutagénesis al azar. Las variantes de Fc optimizadas previamente son variantes de Fc que comprenden al menos una modificación de aminoácido y presentan una mayor unión por el ligando de Fc en comparación con el Fc de tipo salvaje. Las variantes de Fc optimizadas previamente tienen preferiblemente 1 a 4 modificaciones de aminoácidos, en comparación con el Fc de tipo salvaje. Tales variantes de Fc optimizadas previamente se pueden obtener a partir del cribado de una biblioteca generada mediante mutación de un Fc de tipo salvaje. También se denominan variantes de Fc descritas en la técnica anterior (para ejemplos, véase la primera parte anterior de la presente solicitud dedicada a la descripción de la técnica relacionada). El conjunto de variantes de Fc optimizadas previamente comprende varios polipéptidos, más preferiblemente de alrededor de 2 a alrededor de 100 variantes optimizadas previamente.

15 Las bibliotecas generadas a partir de variantes optimizadas previamente permiten seleccionar variantes de Fc más optimizadas. Para una ilustración, véase la tabla 5 de la presente solicitud, que muestra la afinidad de unión de las mejores variantes de Fc seleccionadas a partir del cribado de tal biblioteca.

La etapa (ii), es decir, la expresión de variantes de Fc, se puede realizar mediante métodos bien conocidos usando células hospedantes como se describió previamente. En una realización preferida, la biblioteca de Fc se expresa en la superficie de bacteriófagos (presentación de fagos) usando procedimientos estándar (véase Smith, Science, 1985, 228: 1315).

La etapa (iii) se puede llevar a cabo generando complejos de variantes de Fc-ligando de Fc, y separando entonces las variantes de Fc unidas de las variantes de Fc no unidas. A fin de llevar a cabo esta etapa de separación, el ligando de Fc se puede inmovilizar ventajosamente sobre un soporte sólido, o debería ser capaz de ser inmovilizado sobre un soporte sólido durante el procedimiento de la etapa (iii). Los ejemplos de tales procedimientos se describen en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. La etapa (iii) comprende preferiblemente varias rondas de selección, que permiten identificar los ligandos de Fc más eficaces (para una ilustración, véase el Ejemplo 2).

En la etapa (iv), las propiedades de unión de las variantes de Fc al ligando de Fc se pueden evaluar mediante métodos bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, el experto en la técnica puede llevar a cabo un ELISA apropiado. La variante se selecciona si su señal específica es al menos 1,2 veces más fuerte que la del progenitor de Fc. Los ensayos ELISA apropiados se pueden llevar a cabo sobre Fc aislado o sobre Fc presentado en fago, como se ilustra en el ejemplo II y en el ejemplo IV de la presente solicitud.

Como una alternativa, o con para fines de confirmación, el experto en la técnica puede determinar la constante de disociación usando experimentos de resonancia de plasmones superficiales (SPR), como se ilustra en el ejemplo IV de la presente solicitud. Si la variante tiene una constante de disociación 3 veces menor que la del progenitor de Fc, entonces la mencionada variante se selecciona en la etapa (v).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos a continuación, sin estar limitada a ellos de ningún modo.

Ejemplos

40 Ejemplo 1:

Identificación de variantes de Fc con mayor unión a FcRn en comparación con Fc de tipo salvaje, y caracterización de la unión de dichas variantes

I. Material y métodos

I.1. Expresión y purificación de FcRn humano

45 La expresión de FcRn humano soluble usando el sistema de baculovirus se llevó a cabo por GTP Technology (Labège, Francia) como se describió previamente (Popov et al., Mol. Immunol. 33:521-530 (1996)). El ADNc de cadena α que codifica el péptido líder y dominios extracelulares (codones 1-290) se etiquetó con una secuencia TEV y una etiqueta de 6 x polihistidina. La cadena α derivada y la cadena de $\beta 2$ microglobulina se clonaron en pFastBacDual bajo los promotores de P10 y polihedrina, respectivamente. Se preparó una versión biotinilada de FcRn (FcRn-biot) mediante acoplamiento químico con el kit marcador de proteínas FluoReporter® Biotin-XX, F2610 (Molecular Probes), según el protocolo del fabricante. También se produjo una proteína de fusión que contiene la cadena de $\beta 2$ microglobulina y la cadena α fusionada a la parte amino terminal de la proteína del bacteriófago p3 y la proteína CVDE (FcRn-p3). Se obtuvieron proteínas más de 90% puras tras las etapas de purificación mediante IgG-sefariosa e IMAC.

I.2. Construcción de las bibliotecas de Fc

El gen de Fc humano que codifica los restos de aminoácidos 226-447 (índice EU como en Kabat), es decir, el polipéptido de Fc, derivado de una cadena pesada de IgG1 humana (SEQ n°1) (Poul MA et al., Eur. J. Immunol. 25(7): 2005-2009 (1995), se clonó en el vector fagémido pMG58 (pMG58_Fc226, Fig. 1) como un fragmento de *BamHI/EcoRI* usando protocolos de PCR estándar. El mencionado vector se representa en la Figura 1. Se generaron varias bibliotecas totalmente aleatorizadas usando el procedimiento MUTAGEN™ (documento WO0238756), que usa ADN polimerasas (mutasas) humanas de baja fidelidad para introducir mutaciones al azar homogéneamente a lo largo de toda la secuencia diana. Se usaron tres mutasas distintas (pol β, pol η y pol ι) en condiciones diferentes para crear patrones mutacionales complementarios. Estas polimerasas humanas se produjeron y purificaron como se describió previamente (Mondon et al., Biotechnol J. 2: 76-82 (2007), Emond et al. Protein Eng. Des. Sel. 21: 267-274(2008)).

I. 2-a. Mutagénesis con el procedimiento mutagen™

El gen de Fc humano (gen Fc) se replicó doblemente con mutasas usando el cebador de 5' MG_619: 5'-AGTACTGACTCTACCTAGGATCCTGCCACCGTGC-3' (SEQ ID N°5), y el cebador de 3' MG_621 5'-ACTGCTCGATGTCCGTAATGCGGCCGCGAATTC-3' (SEQ ID N°6) (los sitios de restricción de *BamHI* y *EcoRI* están subrayados, y los caracteres en cursiva corresponden a las colas no específicas). Una mezcla que contiene 0,6 µg del plásmido pMG58_Fc226 como molde (Fc de tipo salvaje para la biblioteca Mut1, o variantes de Fc para la biblioteca Mut2), los cebadores MG_619 y MG_621 (250 nM cada uno) y el amortiguador de replicación apropiado (detallado más abajo), se trató durante 5 min. a 95°C e inmediatamente se enfrió hasta 4°C para desnaturalizar las hebras de ADN. Para pol β, el amortiguador de replicación fue 50 mM de Tris HCl pH 8,8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 1 mM de DTT y 1% (v/v) de glicerol. El amortiguador de replicación para pol η (o pol η y pol ι) fue 25 mM de Tris HCl pH 7,2, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 1 mM de DTT y 2,5% (v/v) de glicerol. Tras la etapa de desnaturalización, se llevaron a cabo replications mutagénicas añadiendo 50 µM de dATP/dCTP, 100 µM de dTTP/dGTP y 1 µg de pol β o 100 µM de dNTPs y 1 µg de pol η (o pol η y pol ι, 1 µg de cada mutasa). La reacción de replicación se llevó a cabo a 37°C durante dos horas. Los productos de replicación se desalaron entonces y se concentraron en columnas Microcon (Millipore).

I.2.b. Amplificación selectiva y clonación de fragmentos mutados

Los productos de replicación obtenidos previamente se amplificaron a través de una PCR selectiva con cebadores de cola. Los cebadores (MG_619 y MG_621) se diseñaron con una cola que no es complementaria al molde, permitiendo la amplificación específica de los fragmentos de ADN sintetizados por las mutasas. Una fracción de los productos de replicación se añadió a una mezcla que contiene el amortiguador de PCR (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de los cebadores de 5' y 3', 200 µM de dNTPs y 1,25 U de Platinum Taq DNA polymerase (InvitroGen). Los ciclos de PCR fueron como sigue, primer ciclo: 2 min. a 94°C, 10 s a 64°C, 30 s a 75°C, 1 min. a 94°C y después 30 ciclos selectivos: 20 s a 94°C y 30 s a 75°C.

Los productos de replicación amplificados se purificaron en geles de agarosa al 1% (p/v), se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y se clonaron en el vector pMG58. Las mezclas de ligación se transformaron en células de *E. coli* XL1-Blue electrocompetentes, y subsiguientemente se sembraron en placas en medio 2YT sólido (16 g/l de peptonas, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 1% (p/v) de glucosa. Tras el crecimiento, se determinó el número de colonias para estimar el tamaño de las bibliotecas, y 96 colonias por biblioteca se sometieron aleatoriamente a PCR y a secuenciación de ADN de alto rendimiento. Las células se rasparon en medio 2YT con 15% de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80°C.

Para la primera ronda de mutagénesis y cribado (MS1), se construyeron cuatro bibliotecas diferentes. Una primera biblioteca se obtuvo usando pol β en el gen Fc de tipo salvaje, y contenía 3,2 x 10⁶ clones (denominada Mut1.1). El ADN de esta primera biblioteca se usó para generar las bibliotecas segunda y tercera, usando respectivamente pol β (3,8 x 10⁶ clones, Mut1.2) y pol η y ι (3,0 x 10⁶ clones, Mut1.3). Esta estrategia en dos etapas de replicación acumulativas permitió incrementar la tasa de mutación. La cuarta biblioteca se generó con polimerasa η sola en el gen Fc de tipo salvaje (1,0 x 10⁶ clones, Mut1.4). Finalmente, estas cuatro bibliotecas se mezclaron proporcionalmente para obtener la biblioteca final denominada Mut1, que representa 1,1 x 10⁷ clones diferentes.

Para la segunda ronda de mutagénesis y cribado (MS2), se construyeron dos bibliotecas diferentes usando un conjunto de ADN de 42 mutantes sencillos y dobles aislados durante MS1 y que tienen unión mejorada a FcRn mediante ELISA de fagos. Una primera biblioteca se obtuvo usando pol β (1,9 x 10⁷ clones, Mut2.1), y una segunda biblioteca con pol η (1 x 10⁶ clones, Mut2.2). Finalmente, estas dos bibliotecas se mezclaron proporcionalmente para obtener la biblioteca final denominada Mut2, que representa 2 x 10⁷ clones diferentes.

I.2.c. Control de calidad de las bibliotecas de Fc mediante secuenciación

La calidad de las diferentes bibliotecas generadas previamente se evaluó mediante PCR en células, para amplificar el gen Fc (con el cebador de 5' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 7) y el cebador de 3' 5'-

TCACGTGCAAAAAGCAGCGGC-3' (SEQ ID NO:8), y secuenciación de alto rendimiento (con el cebador de 5' 5'-TGATTACGCCAAGCTTGC-3' (SEQ ID NO:9). De ese modo, se determinaron las secuencias de 96 clones recogidos aleatoriamente en cada biblioteca (Mut1.1 a Mut1.4 y Mut2.1 a Mut2.2). Finalmente, también se secuenciaron 35 clones de la biblioteca reunida Mut1 y 86 clones de la biblioteca reunida Mut2, para controlar la calidad de la biblioteca final antes del proceso de selección.

Las modificaciones de las secuencias mutadas se analizaron usando un software patentado por MilleGen Mutanalyse4Fc, adaptado para la molécula de Fc a partir del software Mutanalyse 2.5 descrito previamente (Mondon et al., *Biotechnol J.* 2: 76-82 (2007)). Este análisis confirmó que las mutaciones se distribuyen aleatoriamente a lo largo de todo el gen, sin ningún "punto caliente"

- 10 Análisis de Mut1: la frecuencia de las mutaciones de la biblioteca Mut1 es de 6,3 mutaciones por kilobases (kb), lo que significa 4,2 mutaciones por gen (666 nt). Entre estas mutaciones, 81,4% son sustituciones, 16,8% son supresiones y 1,8% son adiciones, introduciendo estas últimas dos categorías desplazamientos del marco en el gen. Cuando se consideran solamente las secuencias en el marco, la frecuencia de las mutaciones es de 4,0 mutaciones por kb, es decir, 2,7 mutaciones por gen (1 a 6 nucleótidos mutados por gen). También se llevó a cabo el análisis de las mutaciones a nivel proteico, para determinar la parte activa de la biblioteca. Finalmente, la biblioteca Mut1 contiene 28,6% de clones que expresan el fragmento de tipo salvaje (no mutado o con mutaciones silenciosas), 40,0% de clones que contienen una secuencia fuera del marco o con un codón de parada (no expresado), y 31,4% de clones con una secuencia mutada (variantes de Fc). Estos últimos clones representan la parte activa de la biblioteca, que comprende $3,5 \times 10^6$ clones diferentes, con un promedio de 2,3 aminoácidos mutados por molécula.
- 15
- 20 Análisis de Mut2: la frecuencia de las mutaciones de la biblioteca Mut2 es de 4,5 mutaciones por kilobases (kb), lo que significa 3,0 mutaciones por gen. Entre estas mutaciones, 96,3% son sustituciones, 3,2% son supresiones y 0,5% son adiciones. Cuando se consideran solamente las secuencias en el marco, la frecuencia de las mutaciones es de 4,3 mutaciones por kb, es decir, 2,9 mutaciones por gen (1 a 7 nucleótidos mutados por gen). A nivel proteico, la biblioteca Mut2 contiene 17,4% de clones que expresan el fragmento de tipo salvaje (no mutado o con mutaciones silenciosas), 9,3% de clones que contienen una secuencia fuera del marco o con un codón de parada (no expresado), y 73,3% de clones con una secuencia mutada (variantes de Fc). Estos últimos clones representan la parte activa de la biblioteca, que comprende $1,5 \times 10^7$ clones diferentes, con un promedio de 1,9 aa mutados por molécula.
- 25

II. Expresión mediante presentación de fagos de las bibliotecas de Fc, y selección de ligantes mejorados de FcRn

- 30 La biblioteca de Fc se expresó en la superficie del bacteriófago M13 usando procedimientos estándar (Smith GP, *Science* 228: 1315 (1985)). Bacterias de *E. coli* XL1-Blue, que contienen la biblioteca Mut1 (vector pMG58), se hicieron crecer en 60 ml de 2YT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina y 1% (p/v) de glucosa, a 30°C, 230 rpm, hasta que se alcanzó una $OD_{600nm} = 0,6$. Las células se infectaron entonces con el fago auxiliar de M13 (M13KO7, Biolabs, relación bacterias/fago = 1/3) a 37°C durante 20 min., y la producción de Fc en fagos se continuó toda la noche a 26°C, 230 rpm, en 2YT/ampicilina/glucosa con IPTG 0,5 mM y canamicina 30 µg/ml. Al día siguiente, los fagos se hicieron precipitar con PEG6000 usando protocolos estándar, se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de fosfato pH 6 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM pH 6,0, denominado P6), y se titularon infectando células XL1-Blue. Se aplicaron tres estrategias de selección usando diferentes condiciones (Fig. 2), y se llevaron a cabo 3 a 8 rondas de selección por estrategia (véase más abajo).
- 35

40 II.1. Selecciones en fase sólida (estrategias 1 y 2) (véase la figura 2A):

Para las selecciones en fase sólida, 4×10^{11} fagos en P6/5% de leche desnatada/0,1% de Tween 20 se incubaron en 8 pocillos de inmunoplasmas Maxisorp revestidas previamente con 0,5 µg de neutravidina y 0,5 µg de FcRn biotinilado (estrategia 1) o 0,5 µg de FcRn-p3 (estrategia 2), y se bloquearon con 5% de leche desnatada en P6. Tras la incubación durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 20 veces con P6/0,1% de Tween 20, y se eluyeron mediante incubación en 100 µl de amortiguador de fosfato pH 7,4 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM pH 7,4)/pocillo durante 2 horas a 37°C. Tras la titulación, los fagos eluidos se usaron para reinfectar 10 ml de bacterias XL1-Blue que crecen exponencialmente, y se sembraron subsiguientemente en placas en medio sólido 2YT/ampicilina/glucosa. Al día siguiente, las células se rasparon en medio 2YT con 15% de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80°C hasta la siguiente ronda de selección.

45

50 II.2. Selección en fase líquida (estrategia 3) (véase la figura 2B):

Para la selección en fase líquida, primeramente se incubaron 4×10^{11} fagos con 250 nM o 100 nM de FcRn biotinilado en 1 ml de P6/5% de leche desnatada/0,1% de Tween 20, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Entonces se añadieron perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (Dynal), previamente bloqueadas con 5% de leche desnatada en P6, a los fagos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los complejos de fagos con perlas se lavaron 15 veces con P6/0,1% de Tween 20 usando un imán (concentrador de partículas magnéticas, Dynal). Los fagos se eluyeron mediante incubación en 500 µl de amortiguador de fosfato pH 7,4 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las perlas se desecharon usando el imán, y se recogieron los fagos eluidos en los sobrenadantes. Tras la titulación, los fagos

55

eluidos se usaron para reinfestar 10 ml de bacterias XL1-Blue que crecen exponencialmente, y se sembraron subsiguientemente en placas en medio 2YT sólido/ampicilina/glucosa. Al día siguiente, las células se rasparon en medio 2YT con 15% de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80°C hasta la siguiente ronda de selección.

II.3. Análisis de secuencias:

5 Durante los procesos de cribado (MS1 y MS2), para cada estrategia, desde la ronda 3 hasta la ronda 8, 48 a 96 clones se secuenciaron tras la PCR en células (como se describe en I.2-c.). El análisis de secuencias se llevó a cabo usando el software patentado de MilleGen AnalyseFc, desarrollado internamente para analizar rápidamente las variantes de Fc seleccionadas. Las variantes de Fc se nombraron según la ronda de selección a partir de la que se aislaron (para el cribado de Mut1: B3A a B6A para la estrategia 1, S3A a S6A para la estrategia 2 y L3A/B a L6A-F para la estrategia 3, para el cribado de Mut2: C3A a C8A para la estrategia 1, T3A a T8A para la estrategia 2 y M3A/B para la estrategia 3). Los números (1 a 96) se refieren a la localización en la placa de PCR para secuenciación. Finalmente, durante todo el proceso de selección, se aislaron 227 clones mutados diferentes para Mut1 y 223 clones mutados diferentes para Mut2. Todos estos clones se caracterizaron usando ensayos ELISA de fagos.

15 II.4. Mutagénesis dirigida

El análisis de las secuencias de las variantes de Fc mejoradas aisladas durante MS1 mostró que un gran número de clones contenía mutaciones similares (N434Y, N434S, P230S, P230T...). Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida para eliminar estas mutaciones a fin de revelar el efecto de las mutaciones asociadas. Estos nuevos mutantes se nombraron en base al clon progenitor, con una A o B añadidas al final del nombre. Se evaluaron 61 nuevos mutantes. Algunos de estos mutantes se ilustran en la tabla 1. Los mutantes considerados como positivos tienen una señal específica entre 1,2 y 2,6 veces mayor que la de Fc de tipo salvaje en el ensayo ELISA de fagos (véase más abajo). Tras MS2, se construyeron varios mutantes nuevos mediante mutagénesis dirigida añadiendo una o dos mutaciones en la región de bisagra (P230S o P228L o P228R o P228L/P230S o P228R/P230S). Estos mutantes se nombran en base al clon progenitor con una letra (A a G) añadida al final del nombre. Se evaluaron 24 nuevos mutantes, y se ilustran en la tabla 5.

II.5. Ensayos ELISA de fagos de las variantes seleccionadas (Figura 3)

Las características de unión de las variantes aisladas durante MS1 y MS2 presentadas en el fago se determinaron usando una prueba de ELISA a pH 6,0 con FcRn-p3 revestido en los pocillos (Fig. 3). De forma breve, las variantes de Fc de fagos se produjeron como clones aislados en una placa de 96 pocillos en cultivos de 800 µl en 2YT/ampicilina/glucosa infectados con el fago auxiliar M13K07 (como se describe en el párrafo 3). Los fagos producidos toda la noche a 26°C se recuperaron en los sobrenadantes después de la centrifugación durante 30 minutos a 3000g. Estos sobrenadantes se diluyeron directamente (1/2 y 1/4) en P6/5% de leche desnatada/0,1% de Tween 20, y se evaluaron en inmunoplasmas Maxisorp previamente revestidas con 0,25 µg de FcRn-p3/pocillo, y se bloquearon con 5% de leche desnatada en P6. Después de la incubación durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1% de Tween-20, y los fagos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (GE Healthcare).

Usando esta prueba de ELISA, se evaluaron las 227 variantes de Fc seleccionadas durante MS1 en comparación con el Fc de tipo salvaje (Fc-WT) y un control positivo. Este control positivo (denominado variante de Fc-H) es el mutante doble T250Q/M428L, y se describió que tiene una afinidad mejorada por FcRn (x28, Hinton PR et al., J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216 (2004)). Esta variante se generó mediante protocolos de PCR estándar con dos oligonucleótidos largos que comprenden los codones mutados y los sitios de restricción: cebador de 5' 5'-CGGGATCCTGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCAAAACCCAAGGACCAACTCATGATCTCCCGGAC-3' (SEQ ID NO:10) y cebador de 3' 5'-GCGAATTCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTG
 GTTGTGCAGAGCCTCATGCAGCACGGAGCATGAGAAG-3' (SEQ ID NO:11) (los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI están subrayados, y los caracteres en gris corresponden a los codones mutados). En el ensayo ELISA de fagos, la variante de Fc-H tuvo una señal específica 3,2 veces más fuerte de media que el Fc de tipo salvaje, es decir, Fc-WT (relación variante/Fc-WT), y entre las 227 variantes de Fc ensayadas, 73 variantes tuvieron una relación/Fc-WT > 3,2, lo que significa que tuvieron una mejor unión a FcRn que la variante de Fc-H (tabla 2). Las variantes positivas procedentes de MS1 y que tienen una única modificación de aminoácido de punto tienen una señal específica de alrededor de 1,2 veces a 3,5 veces más fuerte que la del Fc de tipo salvaje (véase la tabla 1).

Nombre de la variante	Mutación	relación/Fc-WT
B4A_13	P228L	3.5
B3A_32	P228R	3.1
B5A_35	P230S	2.8
L3A_20	V303A	2.8
L5D_47	P230Q	2.7
S3A_05	N434S	2.7
B4A_22A	A378V	2.6
B5A_05	H433R	2.3
S3A_04	P230T	2.3
B4A_08	V397M	2.2
B5A_25B	N315D	2.1
B5A_15	M428L	2.0
L3B_21A	V302A	1.9
S3A_25A	V264E	1.9
L3A_01	T256N	1.8
S3A_08	P387S	1.8
L3A_35	S440N	1.7
L3B_20	E382G	1.7
B3A_08	C226G	1.6
B5A_17A	Q362E	1.6
B5A_43	R416G	1.6
L5A_01	N389K	1.5
S3A_09A	S426T	1.4
S3A_21	N297D	1.4
B3A_17	T307A	1.3

Nombre de la variante	Mutación	relación/Fc-WT
L3B_19	Q386R	1.2
B4A_12	K414R	1.1
B4A_29	K447E	1.1
L4F_02	A330T	1.1
L5D_01	V305A	1.1
L6A_39	N389T	1.1
S5A_18A	F404L	1.1
L5D_29A	Q342K	1.1
B4A_44A	K290R	1.1
L6C_10B	D265G	1.1
L4A_39	D401G	1.0
B6A_34A	N390S	1.0
L6C_44A	T359A	1.0
B5A_04A	N384I	1.0
S3A_24A	E269D	1.0
L5D_09A	T289I	1.0
S3A_01	Q311R	0.9
S3A_42	K360R	0.9
L4F_14	G371D	0.9
L5B_35	N276S	0.9
L6A_29	S267N	0.9
B3A_02A	N421S	0.9
S4A_17B	Q362R	0.9
S3A_26A	T394A	0.9
B5A_14A	Q347R	0.9

Nombre de la variante	Mutación	relación/Fc-WT
B5A_31A	Q342R	1.2
L3A_10	L309P	1.2
L3A_16	A378T	1.2
L3A_25	V264A	1.2

Nombre de la variante	Mutación	relación/Fc-WT
L6B_22	P395S	0.8
B5A_28A	K360N	0.8
L5D_41A	K322R	0.8
L5A_31	N361S	0.5

Tabla 1: Variantes que tienen una única modificación de aminoácido identificadas durante MS1 u obtenidas mediante mutagénesis dirigida

5

Tabla 2: Variantes seleccionadas durante MS1

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-WT
S5A_41	P230T/V303A/K322R/N389T/F404L/N434S	9,0
B5A_01	P228R/N434S	8,2
S5A_26	Q311R/K334R/Q342E/N434Y	7,9
B4A_21	C226G/Q386R/N434Y	6,9
S4A_07	T307P/N389T/N434Y	6,6
B5A_48	P230S/N434S	6,5
L6B_31	P230T/V305A/T307A/A378V/L398P/N434S	6,3

ES 2 726 625 T3

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-WT
S4A_01	P230T/P387S/N434S	6,2
S3A_24	P230Q/E269D/N434S	6,1
S4A_14	N276S/A378V/N434S	5,9
S4A_12	R355Q/T393N/S426T/N434Y	5,8
S5A_47	P230T/N434S	5,8
S5A_43	P230S/V284L/A378V	5,7
B5A_16	S239A/S298G/N315D/Q347R/N434Y/S440R	5,6
B5A_23	Q362E/N434Y	5,4
S4A_24	V264E/R301C/A378V/E382G	5,4
L4A_28	M428L/N434S/Q438R/P445S	5,2
S4A_03	A378V/N434S	5,2
S4A_29	P230Q/F241L/V264E	5,2
S5A_07	A378V/N421T/N434S	5,1
B6A_31	S375G/M428L/H433P	5,0
L5D_09	P230Q/T289I/N434S	4,8
S4A_06	K288R/T307P/N421S/N434S	4,7
B5A_17	N315D/Q362R/N434Y	4,6
S4A_02	A378V/N434Y	4,6
S4A_36	P230Q/V264A/P352S/A378V	4,5
S4A_44	P227S/N434Y	4,5
L5B_14	C226G/N434S	4,4
L6B_41	P230S/M428L	4,4
S6A_48	R355Q/K392E/T393N/S426T/N434Y	4,4
B6A_41	N434Y/Q438R/K447E	4,3
L5D_18	V397M/N434S	4,3
S3A_25	V264E/N434S	4,3
S5A_20	P230Q/F2 41Y/K246R/D270E	4,3
S4A_25	D265G/S408T/N434Y/S444F	4,2
S4A_42	V264A/N434Y/G446A	4,2
B5A_18	V412A/M428L/H433R/N434S/K447E	4,1
B4A_39	E382G/N434S	4,0
L4A_45	P228L/N297D	4,0
L6A_11	M428L/H433R	4,0
S4A_30	V303A/N434S	4,0
B4A_01	E345Q/A378S/E380Q/N434Y	3,9
B4A_22	S383R/V397M/N434S	3,9
S4A_17	V302A/N389T/N434S	3,8
B4A_03	R292W/T307P/A330V/N434S	3,7
B5A_04	N384I/N434Y	3,7
B6A_20	K320T/N434Y/K439R/K447E	3,7
S4A_05	A378V/D401A/N434Y	3,7
S4A_11	N389T/N434Y	3,7
S6A_24	A231T/V397M/N434S	3,7
B4A_46	G371D/N434Y	3,6
B5A_25	F243L/N315D/T411A/N434S	3,6
S3A_06	P230T/A231T/A378V	3,6
B3A_02	N421S/N434Y	3,5
B4A_13	P228L	3,5
S3A_07	V264E/A378V/E382G	3,5
S4A_27	M252L/N434S	3,5
B3A_15	L309P/N434S	3,4
B3A_34	N434Y/S440N	3,4
B6A_34	N315D/A330V/N434S	3,4
S3A_09	S426T/N434S/K439R	3,4
S5A_46	Q386R/N434Y	3,4
B4A_44	P230S/K290R	3,3
B6A_36	F241L/V305A/D356N/N434Y	3,3
L5D_29	Q342K/N434Y	3,3
S5A_05	N434Y/S440R	3,3
S5A_19	F243L/N434Y	3,3

ES 2 726 625 T3

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-WT
S5A_27	A327V/A378V/N389T/N434Y	3,3
B5A_28	K360N/N434Y	3,2
L3A_39	S375G/P395S/N434S	3,2
L4A_15	P395S/N434H	3,2
L4F1_6	N434Y/K447N	3,2
S5A_40	T299M/N434Y	3,2

5 Las 223 variantes seleccionadas durante MS2 se evaluaron usando el mismo protocolo de ELISA, pero en comparación con la variante de Fc-H y la mejor variante de Fc aislada durante MS1 (S5A_41), debido a que la diferencia entre la señal de Fc-WT y la señal de las variantes de Fc fue demasiado grande para compararlas en la misma placa de ELISA. Entre las 223 variantes de Fc evaluadas, 209 variantes de Fc fueron mejores que la Fc-H (relación/Fc-H > 1,1), y 39 variantes de Fc fueron mejores que la mejor variante de Fc aislada durante MS1. Para comparar las variantes con el Fc-WT, se calculó una relación estimada/Fc-WT multiplicando la relación/Fc-H de las variantes por la relación/Fc-WT de la Fc-H (= 3,2) determinada durante MS1 (relación/Fc-WT = 3,2 x relación/Fc-H) (tabla 3)

10

Tabla 3: Variantes de MS2

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Relación/FWT
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	8,9	28,4
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	8,7	27,8
T5A_74	N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	8,6	27,6
C6A_74	V259I/N315D/N434Y	8,5	27,2
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	8,4	26,8
T5A_58	F241L/V264E/T307P/A378V/H433R	8,1	26,1
C6A_72	T250A/N389K/N434Y	8,0	25,7
T5A_93	V305A/N315D/A330V/P395A/N434Y	8,0	25,7
T5A_78	V264E/Q386R/P396L/N434S/K439R	8,0	25,6
T5A_87	N315D/A330V/Q362R/N434Y	7,8	25,0
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	7,7	24,6
C6A_85	V305A/N315D/A330V/N389K/N434Y	7,4	23,8
C8A_15	N315D/A327V/A330V/V397M/N434Y	7,4	23,7
T5A_89	P230T/F241L/V264E/D265G/A378V/N421T	7,1	22,8
T7A_92	V264E/P396L/S415N/N434S	6,7	21,4
T6A_57	P227L/V264E/A378V/N434S	6,4fhr 6,4	20,3
T5A_94	V264E/A378T/P396L	5,8	18,5
T6A_75	P230T/N315D/Q362R/S426T/N434Y	5,7	18,3
C3A_13	C226G/N315D/A330V/N434Y	5,6	17,9
T5A_55	P230L/F241L7F243L/V264E/T307P/A378V	5,6	17,9
T6A_85	T250A/N315D/N325S/A330V/N434Y	5,1	16,3
C5A_39	K290E/N315D/Q342R/E382V/N434Y	5,0	15,9
T5A_57	F241L/N315D/A330V/K392R/N434Y	4,9	15,8
C5A_09	F241L/V264E/T307P/A378V/N434S	4,8	15,2
T6A_22	P230T/V264E/S403T/N434S	4,7	15,2
T5A_81	V264E/A378V/R416K	4,6	14,9
C6A_12	P230T/N315D/Q362E/N434Y	4,6	14,9
C4A_14	C226G/N315D/N434Y	4,6	14,8
T4A_42	C226G/N315D/Q362R/N434Y	4,6	14,7
T5A_25	C226G/V264E/Q347R/K370R/A378V/N434S	4,6	14,7
T4A_48	V308I/N315D/A330V/E382V/N434Y	4,5	14,5
C6A_48	P230T/V264E/A378V/N434S	4,5	14,4
T5A_45	A231T/F241L/V264E/A378T/V397M/N434S	4,5	14,3
T6A_23	P230L/V264E/A378V/N434S	4,4	14,1
C5A_65	P230T/N315D/A330V/Q386K/N434Y	4,2	13,5
C6A_88	C226G/N315D/A330V/N389T/N434Y	4,2	13,4
C4A_13	S267R/T307P/A378V/N421T/N434Y	4,1	13,2
C3A_35	P230S/N315D/P387T/N434Y	4,0	12,9
T4A_37	P230S/V264E/P352S/A378V/N434S	4,0	12,8
C5A_18	P230T/N315D/Q362R/N434Y	3,9	12,3
T3A_22	F241L/V264E/A378V/N434S	3,8	12,2
C5A_12	N315D/Q362E/N389K/N434Y	3,8	12,1

ES 2 726 625 T3

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Relación/FWT
C4A_29	T307P/N315D/N361S/Q362R/N434Y	3,8	12,0
T4A_44	C226G/V264E/A378V/F404L	3,8	12,0
C3A_42	N315D/A330V/N389K/V397M/N434Y	3,7	12,0
C7A_82	P230T/K246R/N389T/P395S/N434Y	3,7	11,9
T4A_31	P230T/F241L/V264E/T307P/A378V	3,7	11,7
T7A_48	P230T/L234R/N315D/A330V/N434Y	3,6	11,6
T7A_49	P230T/N315D/K320E/Q362R/N434Y	3,6	11,6
C7A_43	V264E/T307P/A378V/P396S/N434S	3,6	11,5
T4A_26	V264E/T307P/A378V/E382G/Q386R	3,6	11,5
T4A_19	T307P/A378V/N434S	3,6	11,4
C4A_06	P230T/N315D/A330V/N434Y	3,6	11,4
T4A_46	P230T/N389K/N434Y	3,6	11,4
T8A_24	V264E/T307P/A378V/N434S	3,5	11,1
C6A_36	T307P/N315D/E382G/Q419H/N434Y	3,4	10,9
C7A_68	V264E/N315D/A378V/N390S/G420R/N434Y	3,4	10,9
C5A_15	V303A/N315D/A330V/E382V/N434Y	3,4	10,9
T5A_40	P230T/V264E/T307P/A378V/N421T	3,4	10,8
C4A_28	V264E/A378V/N434Y	3,4	10,8
C4A_41	N315D/A330V/Q362E/N434Y	3,4	10,8
T6A_42	C226G/N434Y	3,4	10,7
T4A_33	P230T/V264E/A378V/N389T/D399N/H433R	3,3	10,7
T5A_24	V264E/A378V/N434S	3,3	10,7
T8A_87	F241L/V264E/A378V/N421T/N434S/L443R	3,3	10,7
T6A_39	C226Y/A378V/N421T/N434S	3,3	10,4
C3A_45	F243L/N315D/A330V/N389K/N434Y	3,3	10,4
C3A_09	S298G/N434Y	3,2	10,4
T6A_21	N315D/A378V/N434Y	3,1	10,0
C6A_13	T307P/A378V/N434Y	3,1	10,0
C3A_27	N315D/S354P/S383N/N434Y	3,1	10,0
T6A_16	P230T/V264E/N315D/K370R/A378V	3,1	9,9
C3A_21	N315D/A330V/S400P/N434Y	3,0	9,8
C3A_08	V264E/P352S/A378V/N434S	3,0	9,7
T4A_18	N315D/Q342R/E382V/N434Y	3,0	9,7
T4A_04	N315D/A330V/E382V/N434Y	3,0	9,7
T7A_58	N315D/Q362E/N434Y	2,9	9,4
C6A_04	Q342R/E382V/N434Y	2,9	9,4
C5A_19	V264A/V305A/N315D/A330V/N434Y	2,9	9,3
T6A_13	P230T/N315D/A330V/Q362R/N434Y	2,9	9,3
T7A_87	P230S/N315D/Q362R/N434Y	2,9	9,3
C3A_24	T307P/N389T/D401G/N421T/N434Y	2,9	9,2
C4A_22	P230T/N434Y	2,9	9,1
T6A_47	P230T/K320T/N434Y	2,8	9,1
C5A_58	V264E/A378V/P396L/N434S	2,8	9,1
T6A_40	P230A/F241L/V264E/A378V/N421T	2,8	9,1
T5A_51	V264E/A378V/F404L/N434S	2,8	9,0
C4A_25	N315D/A330V/V397M/N434Y	2,8	8,9
T3A_15	V264E/A378V/T394A/F404L/N434S	2,8	8,9
C7A_18	V264E/A378V/K414R/N421T/N434Y	2,8	8,9
T7A_18	V264E/A378V/Q386R/N434S	2,8	8,9
C4A_36	N315D/K320T/N434Y	2,8	8,9
C5A_75	T307N/N315D/N434Y	2,8	8,9
C5A_28	T307P/N434Y	2,8	8,8
T5A_05	V264E/E269G/A378V/N421T/N434S	2,7	8,8
C8A_41	N315D/E382V/H433P/N434Y	2,7	8,8
C5A_44	N315D/N389K/N434Y	2,7	8,7
C5A_03	V264A/N315D/N434Y	2,7	8,7
T4A_45	V264E/L309P/P396L/N434S	2,7	8,7
C4A_27	V264A/T299A/A378V/E382G/N434Y	2,7	8,7
T6A_12	V264E/A378V/N421T/N434S	2,7	8,6
T7A_76	V264E/K370R/A378V/P396L/H433R	2,7	8,5

ES 2 726 625 T3

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Relación/FWT
T5A_08	V264E/P291Q/A378V/N434S	2,6	8,5
M3A_21	F241L/V264E/T307P/A378V/N421T	2,6	8,4
C5A_20	N315D/S415D/N434Y	2,6	8,4
T6A_09	P230T/T307A/N315D/A327V/N434Y	2,6	8,3
C7A_27	V264E/T307N/A378V/V397M/N434Y	2,6	8,2
T7A_46	V264E/A378V/G385R/N434S	2,6	8,2
T8A_81	V264A/N315D/E382V/N434Y	2,5	8,2
T7A_57	P230T/T307A/N315D/A330V/Q418E/N434Y	2,5	8,1
C3A_43	N315D/R416G/N434Y	2,5	8,1
C4A_18	N315D/A330V/A378V/N434Y	2,5	8,1
T4A_41	F241R/V264E/T307P/A378V	2,5	8,0
C3A_01	N315D/A330V/N434Y	2,5	8,0
T8A_41	V264E/P343S/A378V/N434S	2,5	7,9
T5A_28	F241L/V264E/A378V/N434Y	2,5	7,9
T3A_10	N315D/A330V/N389K/N434Y	2,4	7,8
T3A_01	V264E/T307P/A378V/N421T	2,4	7,8
T5A_59	Q342R/R355G/E382V/N434Y	2,4	7,8
M3B_09	V264A/N315D/A330V/N389K/N434Y	2,4	7,7
C8A_14	V305A/Q386R/N434Y	2,4	7,6
C4A_01	N315D/Q362R/N389K/N434Y	2,4	7,5
C4A_24	L309P/N315D/A330V/N434Y	2,3	7,5
C7A_13	F241L/V264E/A378V/N421T/N434Y	2,3	7,4
T4A_32	V264E/A378V/H433R	2,3	7,4
T3A_16	F241L/V264E/T307P/A378V	2,3	7,4
C7A_89	T307P/A327T/N389T/N421T/N434Y	2,3	7,4
C5A_50	D270N/N315D/N434Y	2,3	7,3
T3A_41	V264E/T307P/A378V	2,3	7,2
C4A_45	K246R/H285Y/N315D/A330V/N434Y	2,3	7,2
T7A_24	V264E/A378V/N421T/N434Y	2,3	7,2
T4A_28	P230T/A378V	2,2	7,0
T5A_37	S298G/N315D/A330V/N434Y	2,2	7,0
C3A_31	N315D/A330V/N389K/D401G/N434Y	2,2	6,9
C4A_15	E233D/N315D/N434Y	2,2	6,9
C7A_02	V264E/K370R/A378V/N434Y	2,2	6,9
C7A_37	F241L/N315D/N389K/N434Y	2,2	6,9
C7A_69	V264E/H285Y/A378V/N434Y	2,1	6,9
C7A_52	D265G/A378V/N434Y	2,1	6,8
T5A_64	P230T/V264A/N325S/V397M/N434S	2,1	6,7
C7A_23	S298N/A378V/N434Y	2,1	6,6
C7A_67	N315D/A330V/N389R/N434Y	2,1	6,6
T5A_03	V264E/P396L/N434S	2,0	6,4
C8A_08	V264A/N315D/A330V/N434Y	2,0	6,4
C3A_03	N315D/N434Y	2,0	6,4
T3A_47	T307P/A378T/V397M	2,0	6,3
C5A_63	S298N/N315D/A330V/N434Y	2,0	6,3
T7A_17	V264E/P291S/Q362R/A378V/N434Y	2,0	6,3
T4A_43	I332V/K370R/A378V/N434S	2,0	6,3
M3A_18	T307P/A378V/N421T	1,9	6,2
C6A_05	T307A/N315D/A330V/N434Y	1,9	6,2
C3A_15	V264E/T307A/A378V	1,9	6,0
T5A_29	N315D/E382V/N434Y	1,9	6,0
T5A_52	N315D/A327V/A330V/N434Y	1,9	5,9
T8A_45	S375A/A378V/N434Y	1,8	5,9
C6A_21	N315D/A330V/K360R/N389K/N434Y	1,8	5,8
T7A_05	V264E/T359A/N434Y	1,8	5,8
T8A_50	V264E/P396L/N434Y	1,8	5,8
T7A_94	S267N/P352S/A378V/P396L/N434S	1,8	5,8
C6A_35	T250A/N315D/A330V/N434Y	1,8	5,7
C7A_22	N315D/K334E/A378V/N434Y	1,8	5,7
M3A_06	F241L/V264E/A378T/V397M	1,8	5,7

ES 2 726 625 T3

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Relación/FWT
T7A_13	C226Y/N315D/N434Y	1,8	5,7
T5A_90	N315D/A330V/K392R/S424L/N434Y	1,8	5,7
C3A_39	A231V/Q342E/N434Y	1,8	5,6
T3A_13	N315D/V369A/N434Y	1,8	5,6
T8A_34	T307A/N315D/T335A/N434Y	1,8	5,6
M3A_26	V264E/T307P/K340E/Q342R/A378V	1,8	5,6
C3A_23	N389K/N434Y	1,8	5,6
M3A_08	V264E/T307P/A378T/V397M	1,7	5,6
C8A_61	P230T/V264E/P396L/N434Y	1,7	5,5
M3B_04	F241L/V264E/Q342R/A378V	1,7	5,5
C4A_32	V264E/N315D/A378V	1,7	5,4
T7A_35	N315D/Q362R/N434Y/S444P	1,7	5,4
C7A_49	N315D/A330V/T394A/N434Y	1,7	5,3
C7A_28	N315D/S383N/N434Y	1,6	5,3
T6A_58	F241L/V264E/T307P/K338R/A378V/N434S	1,6	5,2
C6A_33	S426T/N434Y	1,6	5,2
C6A_93	V264M/D265N/N315D/A330V/N434Y	1,6	5,0
M3A_22	P230S/A378V/K439R	1,5	5,0
T3A_37	F241L/V264E/A378V	1,5	4,9
T7A_95	N315D/Q342R/N384T/N434Y	1,5	4,9
C3A_18	F241L/V264E/A378V/N421T	1,5	4,8
T3A_28	T307P/A378V/Q418R	1,5	4,8
T3A_06	T307P/A378V	1,5	4,8
C6A_23	V264E/N434Y	1,5	4,7
T3A_21	N315D/K317R/N434Y	1,5	4,7
T3A_34	V264E/P352S/A378V	1,4	4,6
C5A_48	T350A/N434Y	1,4	4,6
T3A_43	V264E/E345G/A378V	1,4	4,5
M3A_01	N361D/N434Y	1,4	4,4
T4A_39	V264E/A378V/P396L	1,4	4,4
C5A_41	N315D/A327T/A330V/Q362R/N434Y	1,3	4,3
M3A_34	S267N/T307N/K370R/A378V	1,3	4,3
T4A_34	V264E/A378V/Q418K	1,3	4,3
C3A_07	T307P/A330T/A378V	1,3	4,2
T3A_11	P291S/N315D/A327V/A330V/N434Y	1,3	4,0
C6A_02	T307N/N315D/A330V/N434Y	1,2	3,9
T3A_09	V264E/A378V/N421T	1,2	3,9
T5A_44	F241L/V264E/T307P/A378T/V397M	1,2	3,8
T3A_12	T256N/A378V	1,2	3,8
M3B_23	F241L/V264E/T307P	1,2	3,8
M3A_35	V264E/N315D/P396L	1,1	3,7
T3A_26	V397A/N434Y	1,1	3,6
T3A_08	V264E/A378V/F404L	1,1	3,5
T6A_93	T299K/Q311R/N315D/N434Y	1,1	3,5
M3A_12	N315D/Q362R/N421D/N434S	1,1	3,4
T3A_20	V303I/N434Y	1,1	3,4
T3A_30	V264E/A378V/V422A	1,1	3,4

En conjunto, durante los procesos de MS1 y MS2 se aislaron 282 variantes de Fc que tienen mejor unión por FcRn que Fc-H. El análisis de las secuencias de estas 282 variantes de Fc reveló que incluyen mutaciones a lo largo de toda la molécula en 115 posiciones diferentes (tabla 4).

5

Tabla 4: Mutaciones de variantes de MS1 y MS2

Posición	Porcentaje de variantes	Modificación
C226	3,9	G o Y
P227	0,7	S o L
P228	1,1	R o L
P230	16,3	S, T, L, A o Q
A231	1,4	T o V

ES 2 726 625 T3

Posición	Porcentaje de variantes	Modificación
E233	0,4	D
L234	0,4	R
S239	0,4	A
F241	9,2	L, Y o R
F243	1,4	L
K246	1,1	R
T250	1,1	A
M252	0,4	L
T256	0,7	N
V259	0,4	I
V264	33,0	A, E o M
D265	1,4	G o N
S267	1,1	N o R
E269	0,7	D o G
D270	0,7	N o E
N276	0,4	S
V284	0,4	L
H285	0,7	Y
K288	0,4	R
T289	0,4	I
K290	0,7	R o E
P291	1,1	S o Q
R292	0,4	W
E294	0,4	supresión
N297	0,4	D
S298	1,8	G o N
T299	1,1	M, A o K
R301	0,4	C
V302	0,4	A
V303	1,4	A o I
V305	2,1	A
T307	16,3	P, A o N
V308	0,4	I
L309	1,1	P
Q311	0,7	R
N315	34,0	D
K317	0,4	R
K320	1,4	T o E
K322	0,4	R
N325	0,7	S
A327	2,5	V o T
A330	17,0	V o T
I332	0,4	V
K334	0,7	E o R
T335	0,4	A
K338	0,4	R
K340	0,4	E
Q342	3,6	R, E o K
P343	0,4	S
E345	0,7	Q o G
Q347	0,7	R
T350	0,4	A
P352	1,8	S
S354	0,4	P
R355	1,1	Q o G
D356	0,4	N
T359	0,4	A
K360	0,7	N o R
N361	1,1	D o S
Q362	6,7	R o E

ES 2 726 625 T3

Posición	Porcentaje de variantes	Modificación
V369	0,4	A
K370	2,1	R
G371	0,4	D
S375	1,1	A o G
A378	37,2	V, T o S
E380	0,4	Q
E382	6,0	V o G
S383	1,4	R o N
N384	0,7	I o T
G385	0,4	R
Q386	2,5	R o K
P387	0,7	S o T
N389	9,2	T, K o R
N390	0,4	S
K392	1,1	E o R
T393	0,7	N
T394	0,7	A
P395	1,4	A o S
P396	4,6	S o L
V397	5,0	A o M
L398	0,4	P
D399	0,4	N
S400	0,4	P
D401	1,1	A o G
S403	0,4	T
F404	1,8	L
S408	0,4	T
T411	0,4	A
V412	0,4	A
K414	0,4	R
S415	0,7	D o N
R416	0,7	K o G
Q418	1,1	R, K o E
Q419	0,4	H
G420	0,4	R
N421	7,8	T, S o D
V422	0,4	A
S424	0,4	L
S426	1,8	T
M428	2,1	L
H433	2,8	R o P
N434	79,1	Y, S o H
Q438	0,7	R
K439	1,4	R
S440	1,1	R o N
L443	0,4	R
S444	0,7	F o P
P445	0,4	S
G446	0,4	A
K447	1,4	E o N

Además, 16 posiciones están preferentemente mutadas y se consideran como posiciones clave: C226, P230, F241, V264, T307, N315, A330, Q342, Q362, A378, E382, N389, P396, V397, N421 y N434. En particular, 4 posiciones están más preferiblemente mutadas, y son consideradas como posiciones clave muy preferidas V264, N315, A378 y N434 (Figura 4).

5

Las variantes de Fc de MS2 que tienen mejor unión para FcRn en comparación con la mejor variante de MS1 (S5A_41) se muestran en la Tabla 5.

ES 2 726 625 T3

Tabla 5: Mejores variantes de MS2

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Desviación estándar	Relación/Fc-WT
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	8,9	1,7	28,4
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	8,7	1,9	27,8
T5A_74	N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	8,6	1,6	27,6
C6A_74	V259I/N315D/N434Y	8,5	1,5	27,2
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	8,4	1,8	26,8
T5A_58	F241L/V264E/T307P/A378V/H433R	8,1	1,5	26,1
C6A_72	T250A/N389K/N434Y	8,0	1,1	25,7
T5A_93	V305A/N315D/A330V/P395A/N434Y	8,0	1,6	25,7
T5A_78	V264E/Q386R/P396L/N434S/K439R	8,0	1,5	25,6
T5A_87	N315D/A330V/Q362R/N434Y	7,8	1,4	25,0
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	7,7	0,9	24,6
C6A_85	V305A/N315D/A330V/N389K/N434Y	7,4	1,5	23,8
C8A_15	N315D/A327V/A330V/V397M/N434Y	7,4	1,8	23,7
T5A_89	P230T/F241L/V264E/D265G/A378V/N421T	7,1	1,2	22,8
T7A_92	V264E/P396L/S415N/N434S	6,7	1,5	21,4
T6A_57	P227L/V264E/A378V/N434S	6,4	1,7	20,3
T5A_94	V264E/A378T/P396L	5,8	1,0	18,5
T6A_75	P230T/N315D/Q362R/S426T/N434Y	5,7	1,3	18,3
C3A_13	C226G/N315D/A330V/N434Y	5,6	0,9	17,9
T5A_55	P230L/F241L/F243L/V264E/T307P/A378V	5,6	1,2	17,9
T6A_85	T250A/N315D/N325S/A330V/N434Y	5,1	1,7	16,3
C5A_39	K290E/N315D/Q342R/E382V/N434Y	5,0	0,6	15,9
T5A_57	F241L/N315D/A330V/K392R/N434Y	4,9	1,0	15,8
C5A_09	F241L/V264E/T307P/A378V/N434S	4,8	0,2	15,2
T6A_22	P230T/V264E/S403T/N434S	4,7	0,9	15,2
T5A_81	V264E/A378V/R416K	4,6	1,0	14,9
C6A_12	P230T/N315D/Q362E/N434Y	4,6	0,6	14,9
C4A_14	C226G/N315D/N434Y	4,6	0,8	14,8
T4A_42	C226G/N315D/Q362R/N434Y	4,6	0,4	14,7
T5A_25	C226G/V264E/Q347R/K370R/A378V/N434S	4,6	0,2	14,7
T4A_48	V308I/N315D/A330V/E382V/N434Y	4,5	0,7	14,5
C6A_48	P230T/V264E/A378V/N434S	4,5	0,8	14,4
T5A_45	A231T/F241L/V264E/A378T/V397M/N434S	4,5	0,6	14,3
T6A_23	P230L/V264E/A378V/N434S	4,4	0,7	14,1
C5A_65	P230T/N315D/A330V/Q386K/N434Y	4,2	0,5	13,5
C6A_88	C226G/N315D/A330V/N389T/N434Y	4,2	0,4	13,4
C4A_13	S267R/T307P/A378V/N421T/N434Y	4,1	0,3	13,2
C3A_35	P230S/N315D/P387T/N434Y	4,0	0,7	12,9
T4A_37	P230S/V264E/P352S/A378V/N434S	4,0	0,5	12,8
S5A_41	P230T/V303A/K322R/N389T/F404L/N434S	3,9	0,6	12,4
C6A_78D	P228R/T256N/A378V/N434Y	28,3	6,7	90,5
T5A_74D	P228R/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	26,0	5,8	83,1
C6A_74D	P228R/V259I/N315D/N434Y	18,6	4,6	59,7
T5A_74F	P228R/P230S/N315D/A330V/N361D/A378V/ N434Y	16,8	5,5	53,8
C6A_78B	P228L/T256N/A378V/N434Y	14,4	1,9	45,9
C6A_69G	P228R/P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	11,9	4,2	38,2
C6A_74C	P228L/V259I/N315D/N434Y	11,0	2,8	35,3
C6A_69E	P228R/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	10,0	2,8	32,0
C6A_78F	P228R/P230S/T256N/A378V/N434Y	9,4	1,8	30,1
C6A_78C	P230S/T256N/A378V/N434Y	9,2	2,4	29,4
C6A_78A	T256N/A378V/N434Y	8,7	1,0	27,8
C6A_74E	P228L/P230S/V259I/N315D/N434Y	8,6	2,7	27,5
C6A_60B	P228R/N315D/M428L/N434Y	8,6	3,9	27,4
C6A_69C	P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	8,4	1,3	26,8
C6A_69F	P228L/P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	8,2	3,1	26,3
T5A_74C	P228L/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	7,5	1,3	24,0
C6A_60D	P228R/P230S/N315D/M428L/N434Y	7,4	1,4	23,8

Nombre de la variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Desviación estándar	Relación/Fc-WT
C6A_74F	P228R/P230S/V259I/N315D/N434Y	7,3	1,9	23,2
T5A_74E	P228L/P230S/N315D/A330V/N361D/A378V/ N434Y	7,1	2,0	22,6
C6A_78E	P228L/P230S/T256N/A378V/N434Y	6,0	0,4	19,1
C6A_74A	P230S/V259I/N315D/N434Y	6,0	1,0	19,0
T5A_74B	P230S/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	5,9	1,0	18,8
C6A_60C	P228L/P230S/N315D/M428L/N434Y	5,3	1,9	17,1
C6A_69D	P228L/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	4,8	1,0	15,3
C6A_60A	P228L/N315D/M428L/N434Y	2,4	1,0	7,7

III. Expresión de las variantes de Fc en *E. coli*

La secuencia de Fc-WT, así como la variante de Fc-H y las variantes de Fc aisladas durante MS1 y MS2, se subclonaron a partir del vector fagémido pMG58 en el vector pMG62, usando sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, que permiten la expresión periplásmica soluble con una etiqueta 6xHis C-terminal para la purificación, y una etiqueta V5 para la detección en los ensayos ELISA. La producción de polipéptidos de Fc recombinantes se realizó en la cepa de *E. coli* HB2151 (inducción con 0,5 mM de IPTG durante 16 horas a 20°C). La purificación se llevó a cabo en Ni-NTA usando protocolos estándar, y se obtuvieron alrededor de 200-500 µg de cada polipéptido.

IV. Caracterización de la unión a FcRn de las variantes de Fc usando ELISA y resonancia de plasmones superficiales (SPR)

IV.1. Caracterización de la unión a FcRn de las variantes S5A_41, S3A_07 y Fc-H en comparación con Fc_WT

IV.1.a. Ensayos ELISA

Las características de unión de las variantes de Fc producidas en un formato soluble se determinaron en comparación con el Fc-WT usando una prueba de ELISA a pH 6,0 con FcRn-p3 revestido en los pocillos. Las variantes de Fc purificadas (como se describe en III) diluidas en serie en P6/5% de leche desnatada/0,1% de Tween-20 se estudiaron en placas Maxisorp revestidas previamente con 0,25 µg de FcRn-p3/pocillo y bloqueadas con 5% de leche desnatada en P6. Tras la incubación durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1% de Tween-20, y las variantes de Fc unidas se detectaron con un anticuerpo anti-V5 conjugado con HRP (invitroGen) (medida de OD450nm) (Figura 5a). La prueba de ELISA se llevó a cabo en S5A_41, la mejor variante de MS1, y en S3A_07, una variante equivalente a la variante de Fc-H, y en la variante de Fc-H. Estas pruebas de ELISA confirmaron que Fc-H, S5A_41 y S3A_07 tuvieron una unión mejorada a FcRn en comparación con Fc-WT (Figura 5b, Figura 5c y Figura 5d). Para cada curva de unión, la medida de la concentración de Fc a saturación del 50% de la curva (EC50) se usó para caracterizar las propiedades de unión de las variantes de Fc en comparación con Fc-WT. Las relaciones obtenidas de ese modo confirmaron que la S5A_41 es un ligante mejor que la variante de Fc-H, y S3A_07 es equivalente a la variante de Fc-H (Tabla 6).

IV.1.b. Ensayos de SPR (resonancia de plasmones superficiales)

La interacción de las variantes de Fc con FcRn inmovilizado se monitorizó llevándose a cabo en un instrumento BIAcore X100 usando un chip sensor CM5 (Biacore, GE Healthcare). La metodología fue similar a la descrita previamente para analizar las interacciones de Fc-FcRn (Popov S. et al., Mol Immunol. 33(6):521-530 (1996)). FcRn soluble recombinante se acopló a la celda de flujo 2 del chip sensor usando química de acoplamiento de amina. Las celdas de flujo se activaron durante 3 min. con una mezcla 1:1 de *N*-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(*N,N*-dimetilamino)propil-*N*-etilcarbodiimida 0,1 M, a un caudal de 30 µl/min. Se inyectó FcRn humano recombinante (5 µg/ml en acetato sódico 10 mM, pH 5,0) a lo largo de la celda de flujo 2 durante 8 min. a 10 µl/min., lo que dio como resultado una densidad de superficie de 1200 a 1300 unidades de respuesta (RU). Las superficies se bloquearon con una inyección durante 3 min. de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5. La celda de flujo 1 se usó como superficie de control sin FcRn, y se preparó de forma similar a la celda de flujo de la muestra. Los datos de esta celda de flujo de blanco se restaron de los datos de muestra.

Los fragmentos de Fc se diluyeron en PBS/Tween-20 (amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM, 0,02% de NaN₃, 0,01% de Tween-20), que se usó como amortiguador de paso en experimentos de unión en el equilibrio. Todas las medidas se llevaron a cabo a 25°C, oscilando las concentraciones de los fragmentos de Fc típicamente de 1 a 200 nM a un caudal de 10 µl/min.

Los datos se recogieron durante 10 min., y se usó un pulso durante 1 min. de PBS, pH 8, que contiene 0,05% de Tween-20, para regenerar las superficies.

Se generaron sensogramas, y se analizaron usando el software de BIAevaluation versión 3.1. La RU en el equilibrio observada para cada inyección se representó gráficamente frente a la concentración de Fc. Los valores de K_d en el

equilibrio se obtuvieron mediante análisis de las gráficas usando el modelo de afinidad de estado estacionario incluido en el software de BIAevaluation.

Las relaciones de K_d obtenidas de ese modo confirmaron que la S5A_41 es un ligante mejor que la variante de Fc-H, y S3A_07 es equivalente a Fc-H (Tabla 6).

5 IV.1.c. Sumario de los resultados obtenidos

La tabla 6, aquí más abajo, muestra la caracterización de la unión a FcRn de las variantes S5A 41, S3A 07 y Fc-H en comparación con Fc WT mediante (i) ELISA de fagos, (ii) ELISA, y (iii) SPR. En todos los casos, la variante S5A 41 presentó una capacidad de unión a FcRn significativamente mayor que Fc WT.

10 Tabla 6: Caracterización de la unión a FcRn de las variantes de Fc usando ELISA y resonancia de plasmones superficiales (SPR). Para ELISA de fagos y ELISA de Fc-rec, la relación se refiere a la señal específica de la variante dividida entre la señal específica de Fc-WT. Para SPR, la relación se refiere a la K_d de Fc-WT dividida entre la K_d de la variante.

Variantes de Fc	ELISA de fagos	ELISA de Fc-rec	SPR
	Relación/Fc-WT	Relación/WT	Relación/Fc-WT
Fc-WT	1,0	1,0	1,0
Fc-H	3,2	27,1	7,6
S3A_07	3,5	25,3	5,2
S5A_41	9,0	66,3	10,7

IV.2. Caracterización de la unión a FcRn de otras variantes de MS2 en comparación con Fc_WT mediante SPR y ELISA

15 Se produjeron varias variantes de Fc de MS2 como se describió anteriormente en la parte III. La capacidad de cada variante para unirse a FcRn se evaluó mediante (i) SPR y mediante (ii) ELISA, como se describe anteriormente en la parte IV.2.b y en la parte IV.2.c, respectivamente.

En la Figura 7 se muestran varios resultados.

20 La Tabla 7, aquí más abajo, muestra los resultados obtenidos para cada variante de MS2 estudiada mediante (i) SPR y (ii) ELISA. También se indican los resultados previos obtenidos mediante ELISA de fagos.

Los ensayos ELISA y de SPR mostraron que todas las variantes de Fc son ligantes mejores que Fc de tipo salvaje para FcRn, lo que se correlacionó con los resultados obtenidos previamente mediante ensayos ELISA en variantes de Fc de fagos.

25 Los valores de K_d de las variantes de MS2 a pH = 6 oscilaron de 5,2 a 22,7 nM, que corresponden a un incremento en la afinidad de 1,3 a 5,8 veces en comparación con Fc-WT.

Tabla 7: Caracterización de la unión a FcRn de las variantes de Fc usando ELISA y resonancia de plasmones superficiales (SPR). Para ELISA de fagos, la relación se refiere a la señal específica de la variante dividida entre la señal específica de Fc-WT. Para ELISA, la relación se refiere a EC₅₀ de Fc-WT dividida entre EC₅₀ de la variante. Para SPR, la relación se refiere a K_d de Fc-WT dividida entre la K_d de la variante.

Nombre del clon	ELISA de fagos relación/WT	ELISA sobre variantes de Fc-recombinante		SPR	
		EC50 (nm)	relación/Fc-WT	K _d (nM) a pH=6	Relación / Fc-WT
Fc-WT	1,0	461,2	1	30,2	1
Fc-H	3,2	16,6	28	10,7	2,8
C6A_60	26,8	2,6	177	5,2	5,8
C6A_74	27,2	7,3	63	5,9	5,2
C6A_78	27,8	4,7	97	5,8	5,2
C6A_69	28,4	3,7	124	7,2	4,2
T5A_74	27,6	5,5	85	7,1	4,2
C6A_66	24,6	4,9	95	9,7	3,1
C6A_72	25,7	7,8	59	12,4	2,4
T5A_78	25,6	4,7	97	12,4	2,4
S5A_41	9,0	9,0	51	13,9	2,2
T5A_94	18,5	166,0	3	13,7	2,2
T5A_58	26,1	9,8	47	15,4	2,0
T5A_81	14,9	144,8	3	22,7	1,3

También se evaluó mediante ensayo ELISA la capacidad de las variantes de Fc para unirse a FcRn a diferentes pH.

Para cada variante de Fc ensayada previamente, los ensayos ELISA se llevaron a cabo a una concentración que proporciona una OD_{450 nm} que oscila de 0,8 a 1,0 cuando se lleva a cabo el ensayo ELISA a pH = 6. Las condiciones experimentales son las descritas previamente en la parte IV.1.a. La Tabla 8, aquí más abajo, indica la concentración de cada variante de Fc usada para llevar a cabo los ensayos ELISA.

5

Tabla 8: Concentración de cada variante de Fc usada para mostrar las distintas afinidades de unión a FcRn a diferentes pH.

	Concentración de Fc (nM)
Fc-WT	200,0
Fc-H	6,2
C6A_69	1,2
T5A_74	1,2
C6A_60	1,2
S5A_41	2,0
C6A_78	2,5
C6A_74	5,0
C6A_72	5,0
T5A_78	12,5
C6A_66	20,0
T5A_58	50,0

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos ELISA obtenidos para cada variante. La OD_{450nm} se correlaciona con la cantidad de variantes de Fc unidas a FcRn inmovilizado (detección de las variantes de Fc unidas con anticuerpo anti-V5 conjugado con HRP). Cuanto mayor es la señal específica a OD_{450nm}, mayor fue la unión de la variante de Fc a FcRn.

10

La Figura 7 muestra claramente que la unión de las variantes de Fc con FcRn varía con el pH. Como se esperaba, la unión de las variantes de Fc a FcRn a pH 7,4 es insignificante en comparación con la unión a pH 6,0.

15

Se puede concluir que las modificaciones de aminoácidos introducidas para obtener las variantes de Fc de la presente invención pueden incrementar significativamente la unión a FcRn a pH 6,0 en comparación con la de Fc-WT, pero no puede modificar significativamente la unión a pH 7,4, que sigue siendo muy baja.

Ejemplo 2:

Producción de variantes de IgG en base a variantes de Fc, y caracterización biológica de dicha IgG.

20

I. Expresión de las variantes de IgG

I.1. Construcción del vector

Las variantes de Fc C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60 y C6-A66 se prepararon en un formato de IgG con una especificidad anti-CD20 en la estirpe celular YB2/0. Para fines comparativos, también se produjo IgG basado en Fc de tipo salvaje (IgG-WT).

25

A fin de maximizar la productividad en la estirpe celular YB2/0, el ADNc de longitud completa de las cadenas ligera y pesada, así como el fragmento de Fc que codifica las variantes, se neosintetizaron con optimización de codones para *Rattus norvegicus*. Se eliminaron los rasgos indeseados tales como sitios de ajuste crípticos o sitios de restricción. Solamente estaba presente un sitio de restricción (ApaI) en la región variable/constante de unión.

30

En una primera etapa, la cadena pesada de tipo salvaje se clonó entre NheI y AclI en el vector de expresión CHK622-08, optimizado para la expresión en YB2/0, dando como resultado el constructo intermedio HCD20-Opti-GA. Entonces, la cadena ligera optimizada se clonó entre los sitios de restricción SpeI y XbaI, dando como resultado el constructo final HKCD20-Opti-GA para la expresión del anticuerpo de tipo salvaje anti-CD20 (denominado aquí más abajo IgG-WT).

35

Las variantes de Fc se prepararon sustituyendo el fragmento de Fc de IgG1 salvaje, presente en HKCD20-Opti-GA, por su versión apropiada. Ésta se clonó entre los sitios de restricción ApaI y AclI (Figura 8a).

La clonación de cada fragmento se realizó mediante procedimientos clásicos de digestión/ligación, antes de la transformación bacteriana. Los constructos de expresión se cribaron mediante digestión enzimática más PCR, y se validaron mediante secuenciación.

I.2. Producción de cultivo celular

5.10⁶ células de la estirpe celular YB2/0 (ATCC, CRL-1662) se electroporaron con cada vector de expresión linealizado, entonces se diluyeron a 25.000 células/ml en medio RPMI 1640 + 5% v/v de FCS dializado (InvitroGen), y se dispensaron a 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos. Tras 3 días de recuperación celular, se aplicó presión de selección añadiendo genética concentrada (Invitrogen) a 0,5 g/l final y metotrexato concentrado (Sigma) a 25 mM final, 2 ml/pocillo. Después de 11 días de incubación, las células resistentes se reunieron para cada uno de los 8 constructos (que codifican las variantes de MS2 de IgG seleccionadas, e IgG-WT), y se diluyeron progresivamente con medio DMEM + 5% v/v de FCS de IgG Ultra-bajo (InvitroGen) hasta que se pudieron incubar, a 2 rotaciones/minuto, dos (2) botellas giratorias de 2 l que contienen 0,9 l de suspensión celular cada una. Las células se dejaron crecer y morir (4 a 5 días) antes de la recogida del sobrenadante, el aclaramiento mediante centrifugación a baja velocidad, y la reducción de volumen mediante ultrafiltración en el filtro Pellicon XL (Millipore).

II. Purificación y caracterización de las variantes de IgG

Los sobrenadantes de cultivo concentrados se inyectaron en una columna HiTrap proteína A FF (GE Healthcare). Los anticuerpos unidos se eluyeron con amortiguador de citrato sódico 0,1 M, pH 3,0, y las fracciones se neutralizaron usando 100 µl de Tris 1 M pH 7,5 por ml de amortiguador de elución. Las fracciones que contienen los anticuerpos se reunieron y se dializaron en PBS pH 6,0, y las muestras se filtraron de manera estéril (0,22 µm) y se almacenaron a 4°C.

Las IgG purificadas se caracterizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. Los geles teñidos con azul de Coomassie indicaron que las IgG, cualquiera que sea la mutación, se purificaron hasta más de 95% de homogeneidad y presentaron las bandas características de cadenas pesadas y ligeras para cada IgG (Figura 8b y Figura 8c).

III. Caracterización de unión a FcRn de las variantes de Fc

Las propiedades de unión de las variantes de IgG a FcRn se determinaron mediante tres ensayos distintos: (i) mediante ensayo ELISA, (ii) mediante SPR, y (iii) mediante ensayo de unión de competición llevado a cabo en la estirpe celular Jurkat que expresa un FcRn truncado en presencia de Rituximab marcado fluorescentemente (una IgG anti-CD20)

III.1. ELISA

III.1.a. Material y método

Las propiedades de unión de las variantes de IgG producidas en Y2B/O se determinaron usando una prueba de ELISA a pH 6,0 con FcRn-p3 revestido en los pocillos. Para fines comparativos, el ensayo ELISA también se llevó a cabo en IgG-WT

Las variantes de IgG purificadas, diluidas en serie en P6/5% de leche desnatada/0,1% de Tween-20, se estudiaron en inmunoplasmas Maxisorp revestidas previamente con 0,1 µg de FcRn-p3/pocillo y bloqueadas con 5% de leche desnatada en P6. Tras incubar durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1% de Tween-20, y las variantes de IgG unidas se detectaron con un Fab'2 anti-Fab'2 humano de cabra conjugado con HRP (Interchim).

Para cada una de las variantes de IgG, el porcentaje de FcRn unido se representó gráficamente frente al logaritmo de la concentración de la variante de IgG. Para cada curva de unión resultante, se determinó la medida de la concentración de IgG con respecto a la saturación del 50% de la curva (EC50), y se comparó con la EC50 de IgG-WT.

III.1.b. Resultados de ELISA

Los ensayos de ELISA mostraron que las variantes de IgG producidas tuvieron una mayor unión a FcRn en comparación con la de IgG de tipo salvaje. Este hecho se ilustra claramente mediante las curvas de unión (véase la figura 9) y mediante los valores de EC50.

Como se ilustra en la tabla 9 aquí más abajo, la EC50 de las variantes de IgG son al menos 5,8 veces menores que la de IgG de tipo salvaje. La mejor EC50 se obtiene para la variante C6A_69.

Tabla 9: Concentración a 50% de saturación (EC50) obtenida a partir de la curva de unión mediante ELISA de cada variante de IgG. La relación se refiere a EC50 de WT dividida entre EC50 de la variante.

Variante de IgG	EC50 (ng/ml)	Relación variante/WT
WT	11060	1,0
C6A_69	1021,6	10,8
C6A_78	1440,9	7,7
T5A_74	1191,8	9,3

Variantes de IgG	EC50 (ng/ml)	Relación variante/WT
C6A_74	2116,0	5,2
C6A_60	1904,0	5,8
C6A_66	1900,4	5,8

III.2. Medidas de afinidad de unión de IgG/FcRn mediante SPR

III.2.a. Material y método

5 La interacción de IgG-WT y de las variantes de IgG con FcRn humano recombinante inmovilizado se monitorizó mediante detección por resonancia de plasmones superficiales (SPR), usando el instrumento BIAcore X100 (GE Healthcare). El protocolo experimental fue similar al usado para determinar la afinidad de las variantes de Fc (véase párrafo IV.2.b. anterior).

10 La RU en el equilibrio observada para cada inyección se representó gráficamente frente a la concentración de Fc. Los valores de K_d en el equilibrio se obtuvieron mediante análisis de las gráficas usando el modelo de afinidad de estado estacionario incluido en el software de BIAevaluation. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante ajuste global de los datos de la fase de asociación y de disociación con un modelo 1:2.

III.2.b. Resultados de SPR

15 La afinidad de unión (valores de K_d) de la IgG-WT por el FcRn humano fue 78,3 nM. Como se ilustra en la tabla 10, los valores de K_d de las 6 variantes de IgG oscilaron desde 10,5 hasta 18,8 nM, lo que mostró un incremento en la afinidad por FcRn a pH 6,0 de 4 a 7 veces en comparación con la de IgG-WT.

Tabla 10: Valores de K_d obtenidos mediante SPR. La relación se refiere a K_d de WT dividida entre K_d de la variante.

20 A fin de determinar los parámetros cinéticos, los conjuntos de datos para la interacción de la IgG WT y de las variantes con FcRn humano se ajustaron con un modelo 1:2 incluido en el software de BIAevaluation. Las curvas obtenidas con IgG WT no se ajustaron con el modelo 1:2, mientras que las curvas obtenidas con la variante de IgG C6A_66 y con todas las otras variantes se ajustaron bien con el modelo 1:2 (datos no mostrados).

	K _d (nM)	Relación WT/variante
WT	78,27	1
C6A_69	18,77	4
C6A_78	17,64	4
T5 A_74	10,55	7
C6 A_74	12,87	6
C6 A_60	13,79	6
C6 A_66	15,18	5

25 Como se ilustra en la tabla 11, aquí más abajo, la mayor afinidad de las variantes de IgG por FcRn humano con respecto al WT estaba motivada predominantemente por una mayor cinética de asociación (valores de k_{on}). De este modo, la relación que se refiere a k_{on} de las variantes dividida entre k_{on} de WT osciló de 13 a 23, que indica un incremento significativo en la afinidad de las variantes por FcRn. Los mayores valores de k_{off} de las variantes de IgG con respecto a WT oscilaron de 2 a 4, presentando un leve impacto de la disociación en comparación con la asociación.

Tabla 11: Velocidades de disociación (k_{off}) y de asociación (k_{on}) determinadas mediante SPR

	k _{on} (x10 ⁵)	k _{off} (1/s)	K _D (nM)
WT	0,36	0,00355	99
C6A_69	7,60	0,00837	11
C6A_78	8,19	0,00981	12
T5A_74	5,22	0,00885	17
C6A_74	5,81	0,01349	23
C6A_60	8,12	0,00788	9,7
C6A_66	4,83	0,01264	26

30 III.3. Unión a FcRn de Jurkat

III.3.a. Material y método

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia de competición para evaluar la capacidad de IgG WT y de las variantes para interactuar con FcRn mediante un método adaptado del descrito por Dall'Ozzo et al. (Dall'Ozzo S,

Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G, Cancer Res., 2004 Jul 1; 64(13):4664-9).

De forma breve, IgG WT y las variantes se diluyeron en PBS pH 6 a una concentración final que oscila de 0,06 a 2 mg/ml, y se incubaron con FcRn de Jurkat (150000 células) en presencia de Rituximab conjugado con Alexa (Rituximab marcado), a una concentración de 50 µg/ml. Después de 20 minutos, las células se analizaron mediante citometría de flujo, a fin de cuantificar la unión de Alexa-Rituximab. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la intensidad de fluorescencia media (MFI), refiriéndose 100% a la intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida con Rituximab conjugado con Alexa solo (es decir, sin competidor), y refiriéndose 0% al valor de MFI medido cuando FcRn de Jurkat no se incubó con Rituximab conjugado con Alexa. Cada experimento se realizó por triplicado.

Los controles comprenden la incubación de (i) Rituximab no marcado o (ii) IgG-WT.

Para cada IgG ensayada, la MFI se representó gráficamente frente al logaritmo de la concentración de IgG. Se determinó la concentración (IC50) de cada IgG ensayada que proporciona una inhibición de 50% de la señal de MFI.

En la solicitud de patente francesa, publicada como FR 2894983, también se puede encontrar una descripción general de este ensayo.

III.3.b. Resultados experimentales

En la Figura 11 se muestran varios resultados, en la que se ha determinado la unión de Ritixan y de diversas variantes según la invención a FcRn de Jurkat, como se describe en la sección Materiales y Métodos anterior, y se expresa como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI).

Como se ilustra en la tabla 12 aquí a continuación, la IC50 obtenida para las variantes de la invención son significativamente menores que la obtenida para WT-IgG. La disminución en la IC50 para las variantes de IgG de la invención fue de 40 a 60 veces, excepto para C6A_66.

Tabla 12: IC50 obtenida mediante ensayo de competición de unión realizado en células Jurkat que expresan FcRn en presencia de Rituximab marcado fluorescentemente. Los valores "50%RTX=1" consisten en valores de IC50 que también se expresan en µg/ml.

	IC50 (µg/ml)	50% RTX=1
Rituximab	NA	≠ 1
WT	219	5
C6A_69	4	240
C6A_78	4	275
T5A_74	4	224
C6A_74	5	200
C6A_60	3	234
C6A_66	21	48

III.4. Conclusión

Los tres ensayos distintos llevados a cabo para caracterizar las propiedades de unión de las variantes de IgG a FcRn proporcionaron resultados consistentes. En todo caso, las variantes de IgG de la invención presentaron una mayor unión significativa a FcRn en comparación con la de IgG de tipo salvaje.

IV. Caracterización funcional de variantes de IgG, y comparación con IgG-WT y LFB-R603

Se evaluó la capacidad de las variantes de IgG para unirse a receptores de Fcγ, y sus actividades de ADCC y CDC, a fin de caracterizar totalmente sus funciones biológicas.

IV.1. Unión de las variantes de IgG a hFcγRIIIA

IV.1.a. Ensayo ELISA: Unión de la variante de IgG a hFcγRIIIA recombinante inmovilizado

El FcγRIIIA recombinante inmovilizado (alotipo F158) se biotiniló con el kit EZ-link NHS-PEO (Pierce), se diluyó a 1 µg/ml en amortiguador de ensayo (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,35, 0,05% de Tween-20, 0,1% de BSA), y se revistió sobre placas de ELISA de estreptavidina react-bind™ (Pierce) durante 2 h a temperatura ambiente. Durante este tiempo de incubación, se prepararon complejos de IgG-F(ab')₂ anti-F(ab')₂ en amortiguador de ensayo mezclando 5 µg/ml de IgG y 2 µg/ml de F(ab')₂ anti-F(ab')₂ humano marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de los complejos a las placas, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Tras lavar las placas con

amortiguador de ensayo, los complejos unidos a hFcγRIIIA se detectaron con TMB (Pierce). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de placas (Tecan).

Para cada una de las variantes de IgG, el porcentaje de FcγRIIIA unido (que se obtiene a partir de OD450nm) se representó gráficamente frente a la concentración de la variante de IgG.

- 5 Como se muestra en la figura 10, la unión de las variantes de IgG a hFcγRIIIA es similar a la de IgG WT, excepto para la variante C6A_66, que no se une a hFcγRIIIA.

IV.2. Actividad de ADCC

- 10 Se purificaron células asesinas naturales (células NK) a partir de la sangre periférica de donantes sanos mediante la técnica de agotamiento negativo desarrollado por la compañía Miltenyi. La prueba de ADCC comprende incubar las células NK con las células diana de la estirpe Raji que expresa el receptor CD20, en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD20. Tras 16 horas de incubación, la citotoxicidad inducida por los anticuerpos anti-CD20 se mide cromogénicamente cuantificando en los sobrenadantes celulares el nivel de una enzima intracelular denominada lactato deshidrogenasa (LDH), que es liberada por las células diana lisadas.

Los resultados se muestran en la Figura 12.

- 15 Los resultados de la lisis específica se expresan como el porcentaje de lisis como una función de la concentración de anticuerpo. Se calculó EC50 (cantidad de anticuerpo que induce un 50% de lisis máxima) usando el software PRISM. Los experimentos de control se llevaron a cabo con (i) Rituximab, (ii) WT-IgG producida en células Y2/0 y LFB-R603, que es un anticuerpo anti-CD20 conocido por que tiene función de ADCC que se ha descrito por de Romeuf et al. en 2004 (de Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, Fournier N, Gaucher C, Glacet A, Jorieux S, Bihoreau N, Behrens CK, Béliard R, Vieillard V, Cazin B, Bourel D, Prost JF, Teillaud JL, Merle-Béral H. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcγRIIIA/CD16. Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6):635-43), así como en la solicitud PCT nº WO 2006/064121.

- 20 La Tabla 13, aquí más abajo, muestra la EC50 para cada variante, y compara la función de ADCC de las variantes de IgG con la de LFB-R603 y WT-IgG.

Todas las variantes de IgG presentan actividad de ADCC, excepto la variante C6A_66. Esta variante no tiene actividad de ADCC, lo que es consistente con su afinidad muy baja por FcγRIII.

Se debería observar que C6A_69, C6A_60 y C6A_74 tienen una mayor actividad de ADCC en comparación con IgG-WT. Las otras variantes (a saber, C6A_78 y T5A_75) tienen una actividad de ADCC similar a la de IgG-WT.

- 30 Tabla 13: EC50 (cantidad de anticuerpo que induce 50% de lisis máxima) obtenida a partir del ensayo de ADCC. La relación se refiere a la EC50 de la variante dividida entre la EC50 de LFB-R603.

	EC50 (µg/ml)	Relación R603/Variante
LFB-R603	0,2	1,0
Rituximab	>5000	N.A.
WT	1,2	6,0
C6A_69	0,5	2,3
C6A_78	1,0	4,7
T5A_74	0,7	3,3
C6A_74	0,2	0,9
C6A_60	0,3	1,6
C6A_66	>5000	N.A.

IV.3. Actividad de CDC

- 35 En esta técnica, las células CD20+ diana de la estirpe Raji se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD20 (0 a 5000 ng/ml), en presencia de suero de conejo neonato como fuente de complemento (referencia de Cedarlane: CL3441, dilución hasta 1/10). Tras 1 hora de incubación a 37°C, la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas se mide cromogénicamente (kit de detección de citotoxicidad de Roche Applied Sciences), y se usa para cuantificar la citotoxicidad dependiente del complemento mediada por los anticuerpos. Los resultados se expresan como un porcentaje de la lisis. EC50 (cantidad de anticuerpo que induce 50% de la lisis máxima) y Emax (porcentaje de lisis máxima) se calcularon usando el software PRISM.

ES 2 726 625 T3

La Tabla 14, aquí más abajo, muestra la Emax y la EC50 obtenidas para cada variante.

El nivel de actividad de CDC varía con las variantes de IgG.

C6A_78 y C6A_60 tienen una actividad de CDC significativamente mayor que la de IgG-WT, mientras que C6A_69, T5_74 y C6A_66 presentan baja actividad de CDC.

- 5 La actividad de CDC de la variante C6A_74 es similar a la de IgG-WT.

Tabla 14: EC50 (cantidad de anticuerpo que induce 50% de lisis máxima) obtenida a partir del ensayo de CDC.

	Emax (% de lisis)	EC50 (ng/ml)
LFB-R603	61,87	514,0
Rituximab	65,60	419,0
WT	57,32	541,1
C6A_69	N, A,	>5000
C6A_78	75,99	117,3
T5A_74	N,A,	> 5000
LFB-R603	61,87	514,0
C6A_74	59,90	458,4
C6A_60	77,22	92,66
C6A_66	10,28	935,1

IV.3. Conclusión

- 10 Las seis variantes de IgG producidas recombinantemente en la estirpe celular Y2B/0 tienen una mayor unión al receptor FcRn en comparación con IgG-WT (producida en la misma célula hospedante y en la misma condición).

Las variantes de IgG tienen al menos la misma afinidad de unión por FcγRIII y al menos la misma actividad de ADCC que IgG-WT, excepto C6AA_66, que muestra una mala afinidad por FcγRIII.

Las variantes de IgG presentan distintas actividades de CDC.

- 15 Para concluir, en algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos según la invención permiten obtener variantes de IgG que tienen una mayor unión para FcRn combinada con una o más actividades efectoras de Fc que son al menos similares a las de la IgG progenitora correspondiente (es decir, IgG-WT).

En otro aspecto, las modificaciones de aminoácidos según la invención permiten obtener variantes de IgG que tienen una mayor unión para FcRn combinada con al menos una menor actividad efectora de Fc, tal como CDC o ADCC.

- 20 La Tabla 15, aquí más abajo, muestra las conclusiones principales referidas a las variantes de IgG del presente estudio.

Tabla 15: Resultados principales obtenidos para las variantes de IgG de la invención en comparación con IgG-WT; ++: mayor unión a FcRn en comparación con WT-IgG; ↗: mayor actividad en comparación con WT-IgG; ↘: menor actividad en comparación con WT-IgG; ✓: actividad similar a la de WT-IgG

Variante	Mutaciones	Unión a FcRn	ADCC	CDC
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	++	↗	↘
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	++	✓	↗
T5A_74	N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	++	✓	↘
C6A_74	V259I/N315D/N434Y	++	↗	✓
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	++	↗	↗
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	++	↘	↘

25

Tabla 7: Secuencias incluidas en el listado de secuencias

SEQ ID NO:	Secuencias
1	Fc de IgG1 humana (restos 226-447 según el índice EU como Kabat)
2	Fc de IgG2 humana

ES 2 726 625 T3

SEQ ID NO:	Secuencias
3	Fc de IgG3 humana
4	Fc de IgG4 humana
5	Cebador
6	Cebador
7	Cebador
8	Cebador
9	Cebador
10	Cebador
11	Cebador
12	Fragmento de cadena pesada del alotipo G1m1,17 de IgG1 humana
13	Fragmento de cadena pesada del alotipo G1m3 de IgG1 humana
14	Fragmento de la cadena pesada de IgG2 humana
15	Fragmento de la cadena pesada de IgG3 humana
16	Fragmento de la cadena pesada de IgG4 humana

Listado de secuencias

- <110> LFB Biotechnologies
- <120> Variantes de Fc optimizadas
- 5 <130> W337EP
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3

- <210> 1
- 10 <211> 222
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> característica diversa
- 15 <222> (131)..(131)
- <223> Para el alotipo G1m1,17, X es D
- <220>
- <221> característica diversa
- <222> (131)..(131)
- 20 <223> Para el alotipo G1m3, X es E

ES 2 726 625 T3

<220>

<221> característica diversa

<222> (133)..(133)

<223> Para el alotipo G1m1,17, X es L

5

<220>

<221> característica diversa

<222> (133)..(133)

<223> Para el alotipo G1m3, X es M

<400> 1

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

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

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

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

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

10

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

ES 2 726 625 T3

85 90 95

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 2

<211> 221

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60

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

ES 2 726 625 T3

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

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

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 3

<211> 222

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

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

Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val

ES 2 726 625 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

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

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

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

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 5

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

10 agtactgact ctacctagga tctgcccac cgtgc 35

<210> 6

<211> 35

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

ES 2 726 625 T3

<400> 6

actgctcgat gtcctacta tgcggccgcg aattc 35

<210> 7

5 <211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

10 <400> 7

caggaaacag ctatgacc 18

<210> 8

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

20 <400> 8

tcacgtgcaa aagcagcggc 20

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

tgattacgcc aagcttgc 18

30

<210> 10

<211> 100

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Cebador

<400> 10

ES 2 726 625 T3

cgggatcctg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct 60
tcccccaaa acccaaggac caactcatga tctccoggac 100

<210> 11

<211> 84

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

gcgaattctt taccoggaga cagggagagg ctcttctgcg tgtagtggtt gtgcagagcc 60

10 tcatgcagca cggagcatga gaag 84

<210> 12

<211> 232

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 726 625 T3

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

- 5 <210> 13
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 13

ES 2 726 625 T3

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 14

5 <211> 228

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 726 625 T3

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

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

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

Ser Pro Gly Lys
225

- 5 <210> 15
- <211> 279
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 15

ES 2 726 625 T3

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

ES 2 726 625 T3

115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn
 210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 245 250 255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275

<210> 16

<211> 228

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

ES 2 726 625 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 180 185 190

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

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

Ser Leu Gly Lys
 225

REIVINDICACIONES

1. Una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido progenitor, y comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo las mencionadas al menos dos modificaciones de aminoácidos:

- 5 (i) una modificación de aminoácido que es 434Y, y
 (ii) al menos una modificación de aminoácido que es 315D, o 378V,

de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

10 2. Una variante según la reivindicación 1, comprendiendo la mencionada variante al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 259I/315D/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y de la región Fc en comparación con dicho polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

15 3. Una variante según la reivindicación 2, en la que la mencionada variante comprende además al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 241L, 250A, 256N, 259I, 267R, 290E, 305A, 307P, 307A, 308I, 325S, 327V, 330V, 342R, 361D, 362R, 362E, 378V, 382V, 383N, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 397M, 421T, 426T y 428L de la región Fc, en comparación con el polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

20 4. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la mencionada variante comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 315D/330V/362R/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 308I/315D/330V/382V/434Y, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y y 230S/315D/387T/434Y de la región Fc en comparación con dicho polipéptido progenitor, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

5. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha variante es un anticuerpo.

6. Una variante según la reivindicación 5, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.

30 7. Una composición farmacéutica que comprende una variante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Un ácido nucleico aislado que codifica una variante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Una célula hospedante que contiene el vector de la reivindicación 9.

35 11. Un método para producir una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 10 de manera que se exprese el ácido nucleico.

12. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como un medicamento.

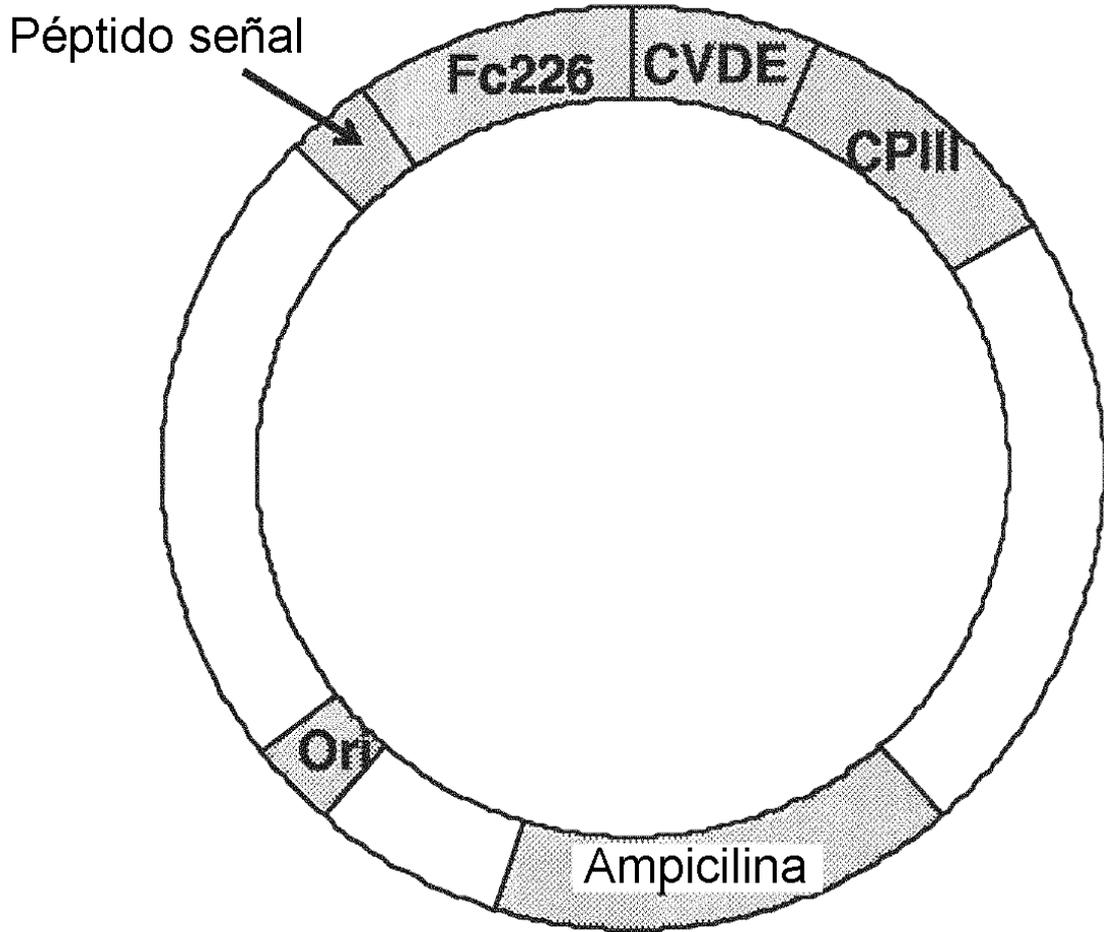


FIGURA 1

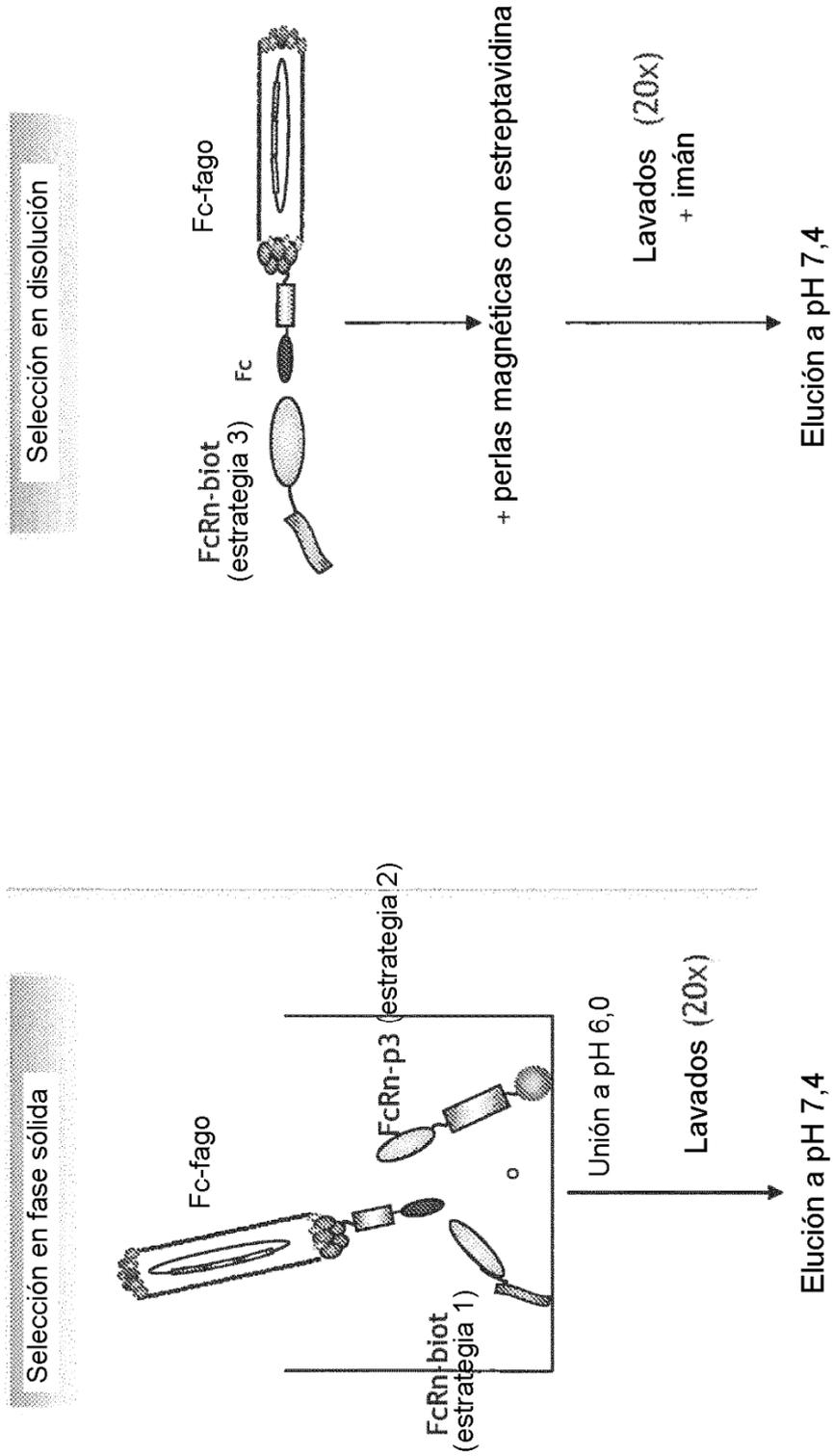


FIGURA 2A

FIGURA 2B

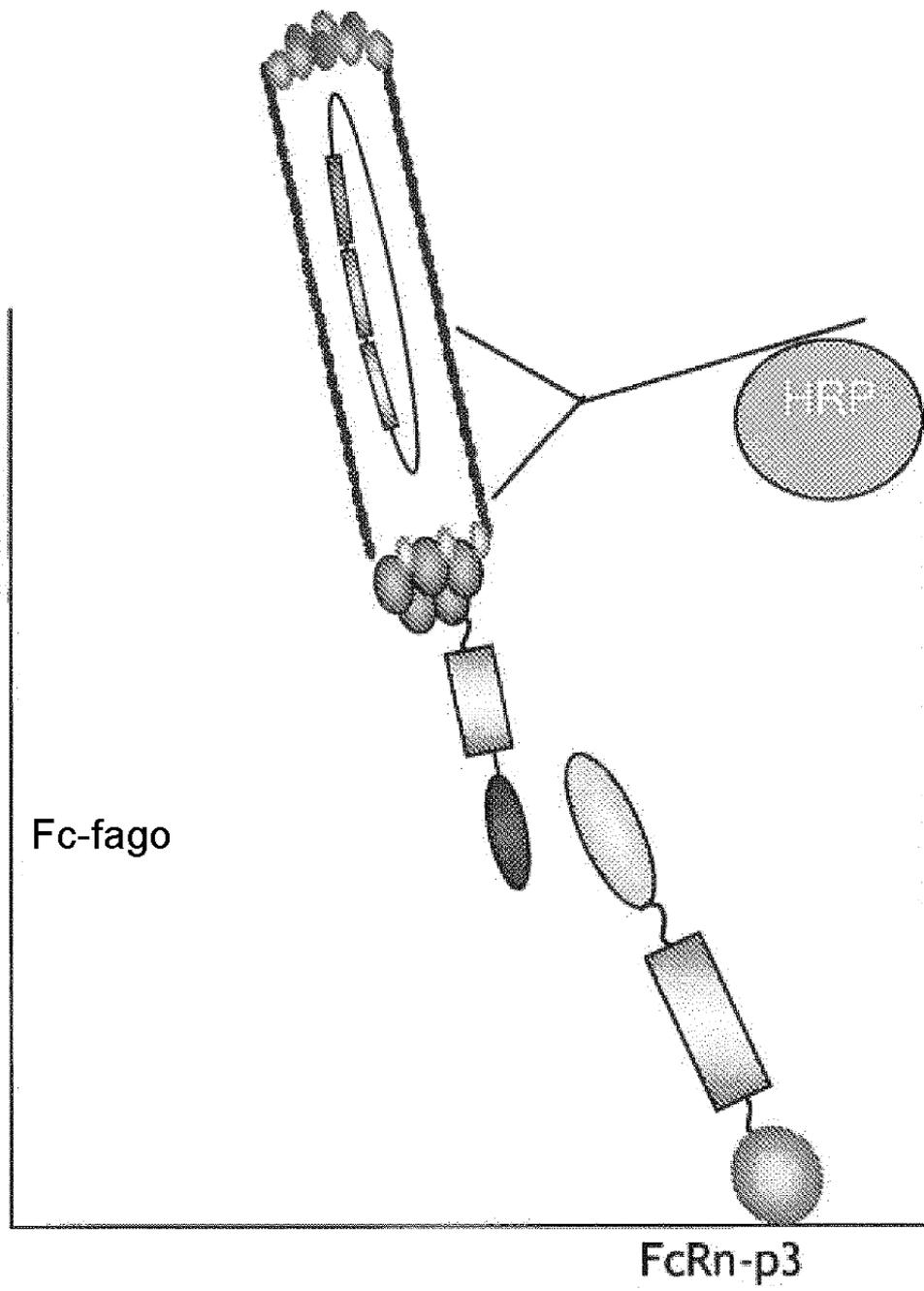


FIGURA 3

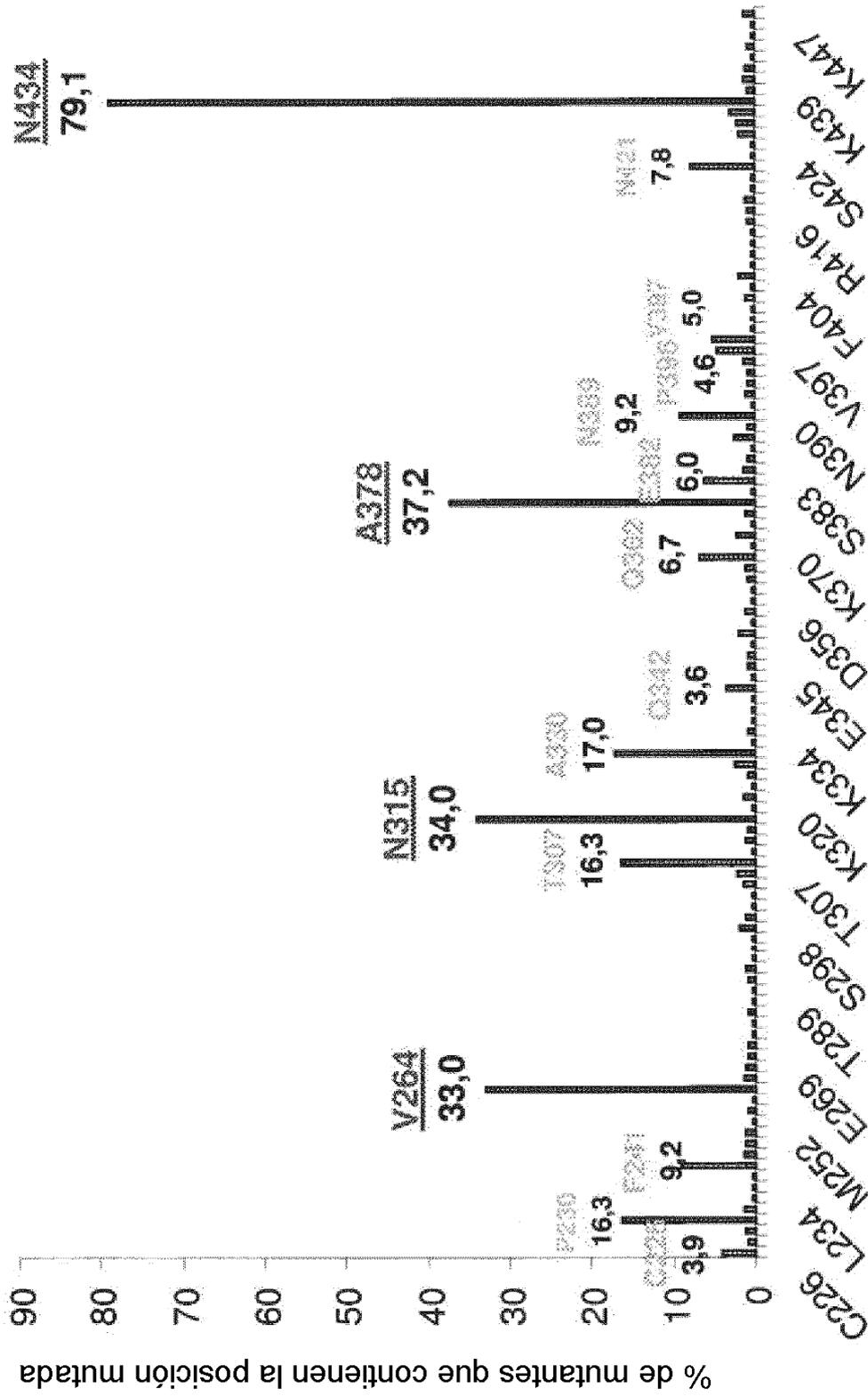


FIGURA 4

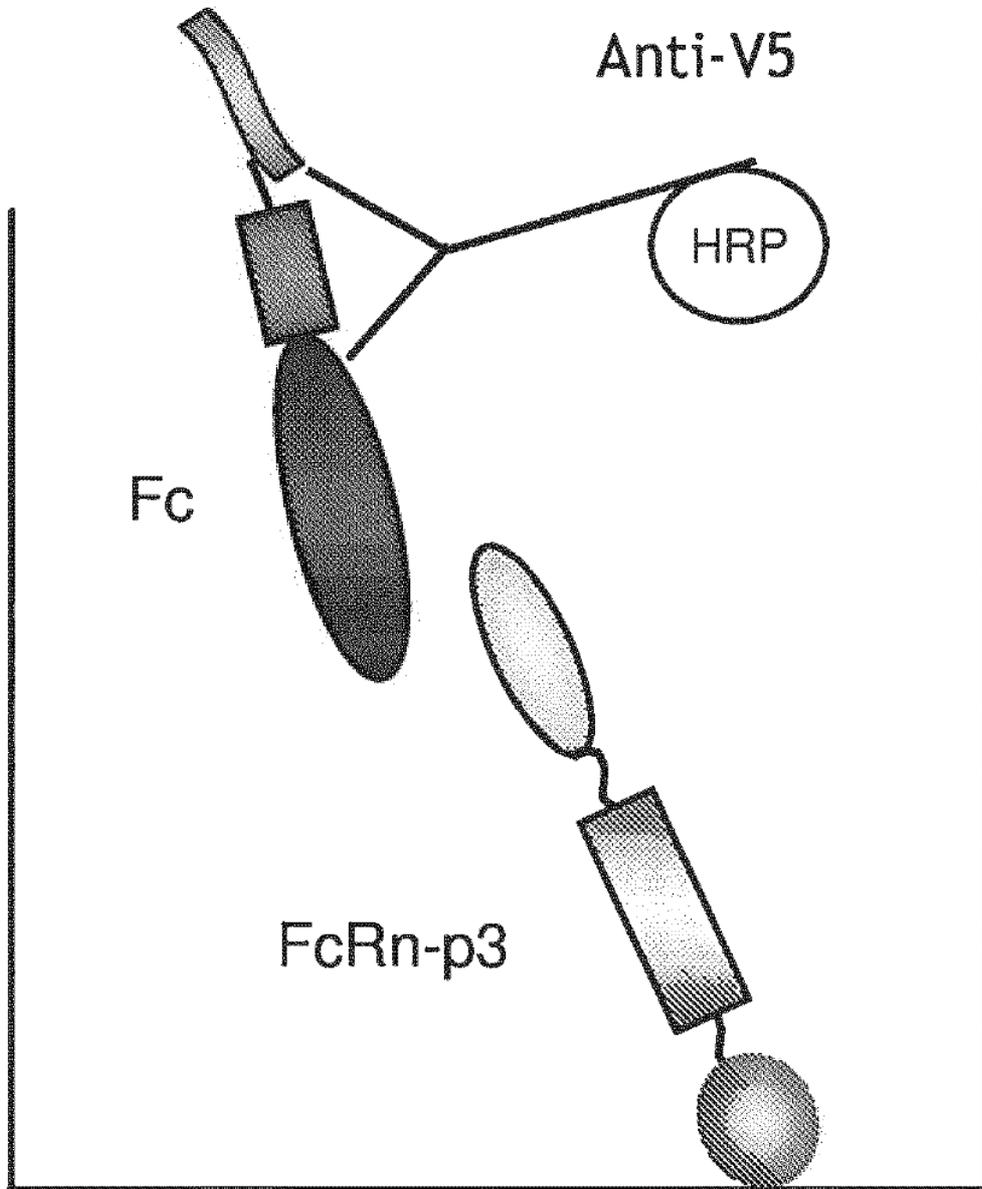


FIGURA 5A

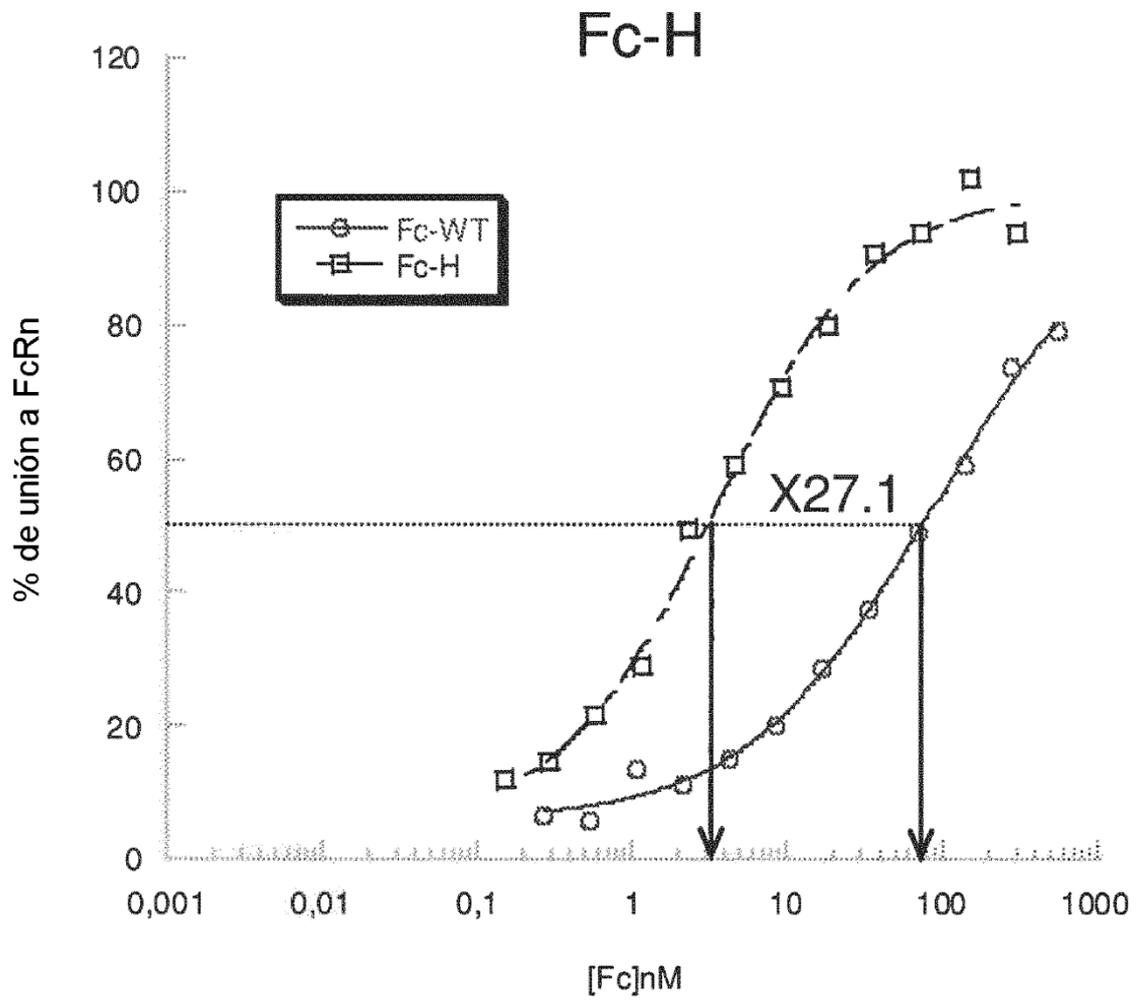


FIGURA 5B

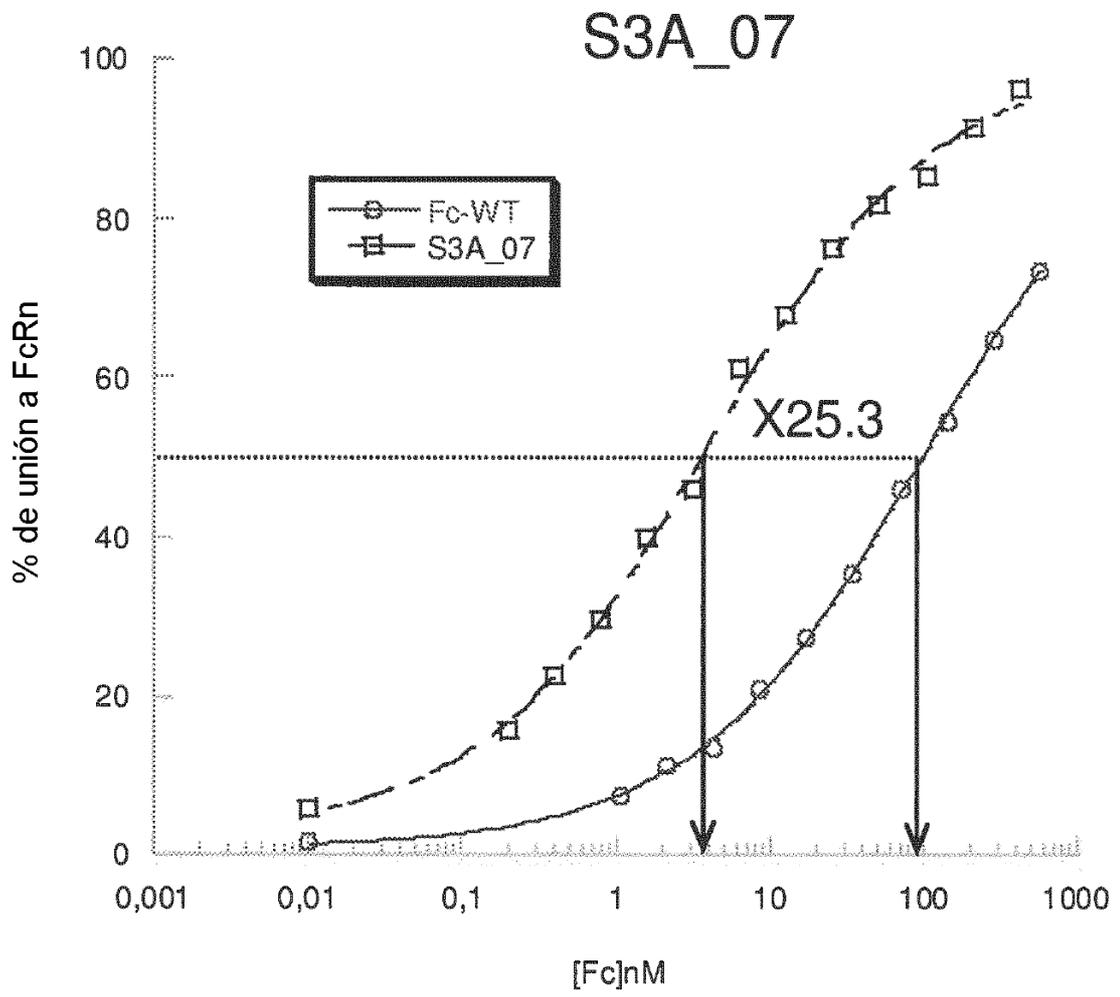


FIGURA 5C

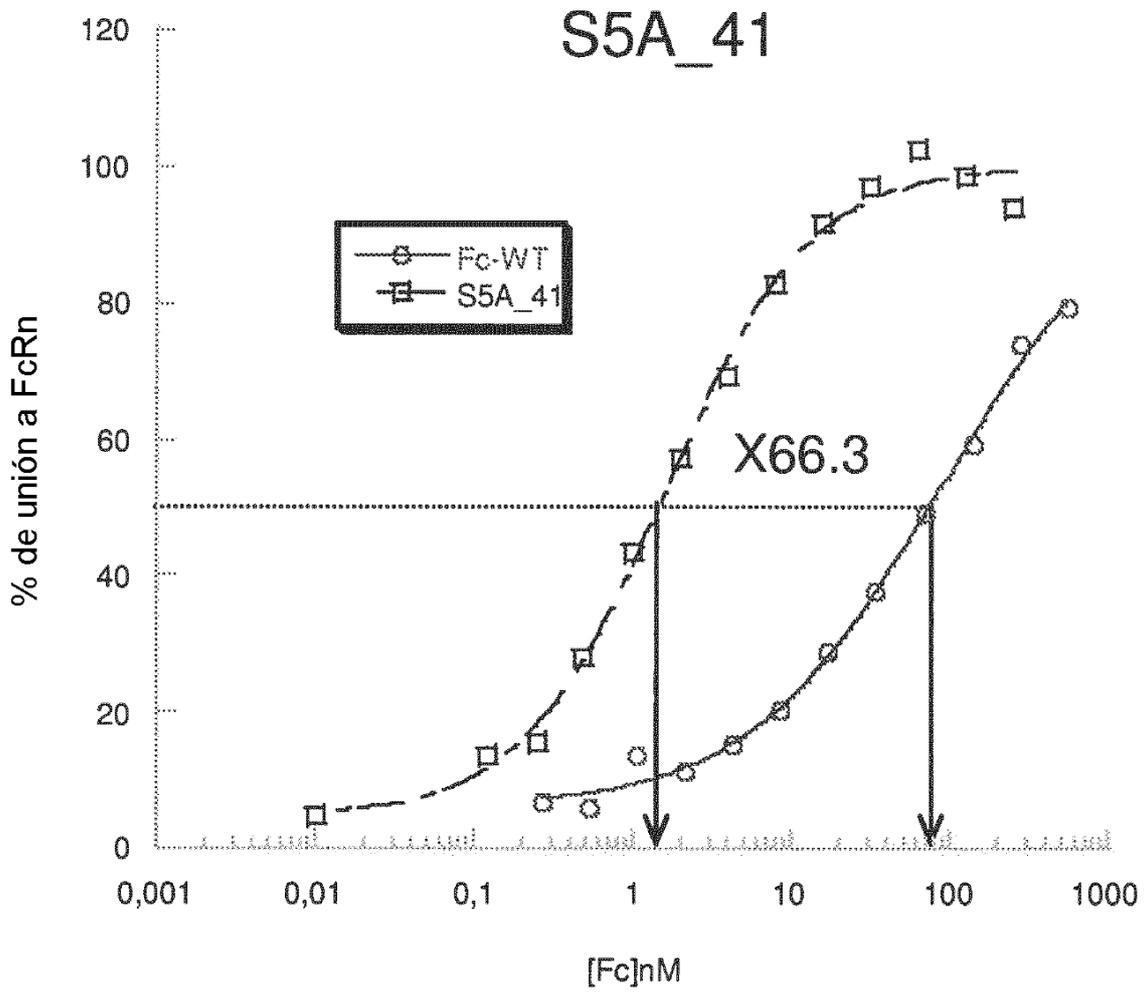


FIGURA 5D

226

```

IgG1m(1, 17)  EPKSCDK--THT-----CPPCPAPEL
IgG1m(3)      EPKSCDK--THT-----CPPCPAPEL
IgG2,        ERKCCVE-----CPPCPAPPV
IgG3         ELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEL
IgG4         ESKYG-----PPCPS-PAPEF

IgG1m(1, 17)  LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG1m(3)      LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG2         -AGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG3         LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTF
IgG4         LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTF

IgG1m(1, 17)  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT
IgG1m(3)      RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDEMTKNQVSLT
IgG2         RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYITLPPSRDEMTKNQVSLT
IgG3         RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYITLPPSRDEMTKNQVSLT
IgG4         RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLT

IgGm(1, 17)   CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL
IgG1m(3)      CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEGL
IgG2         CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL
IgG3         CLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCSSVMHEAL
IgG4         CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEAL

HNHYTQKLSLSLSPGK
HNHYTQKLSLSLSPGK
HNHYTQKLSLSLSPGK
HNRFYQKLSLSLSPGK
HNHYTQKLSLSLSPGK

```

FIGURA 6

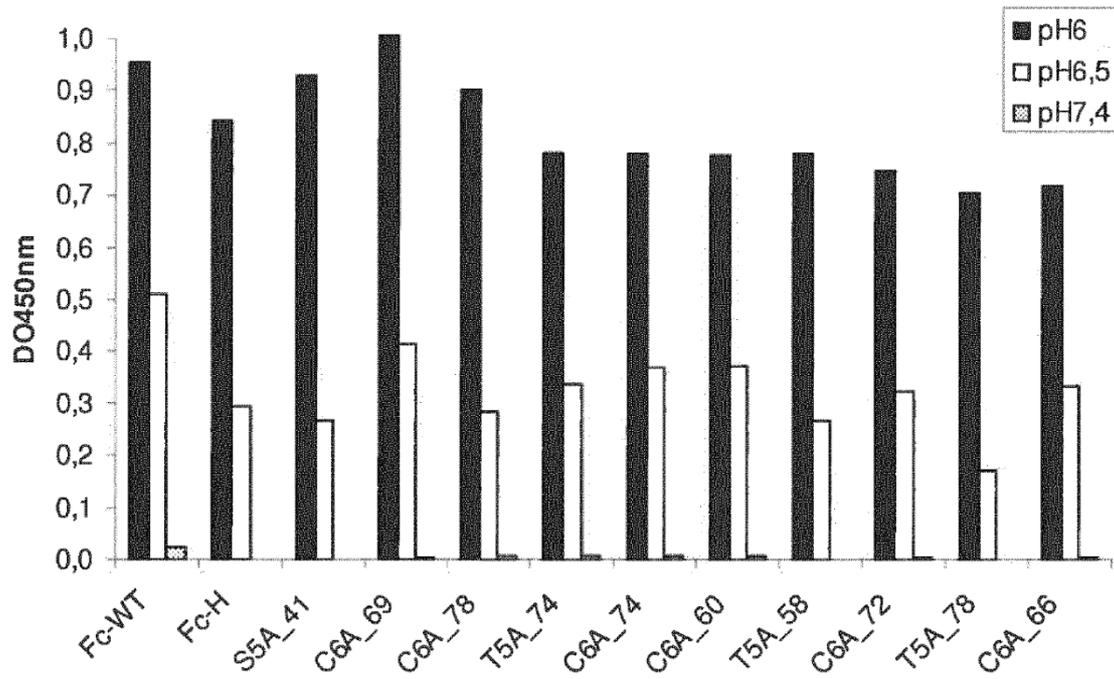


FIGURA 7

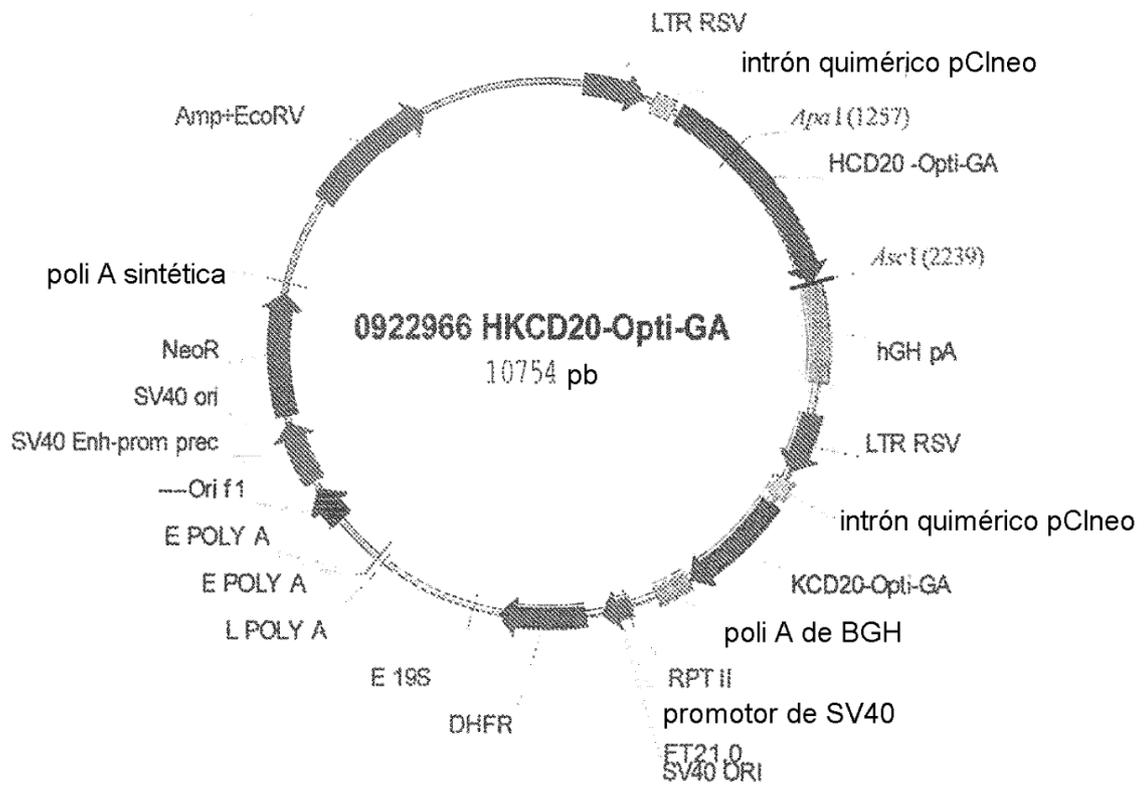


FIGURA 8a

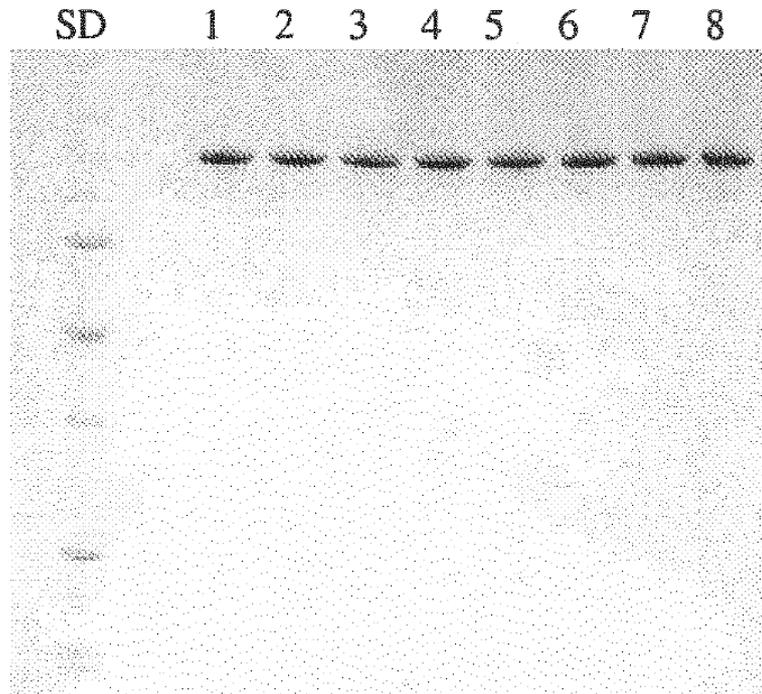


FIGURA 8b

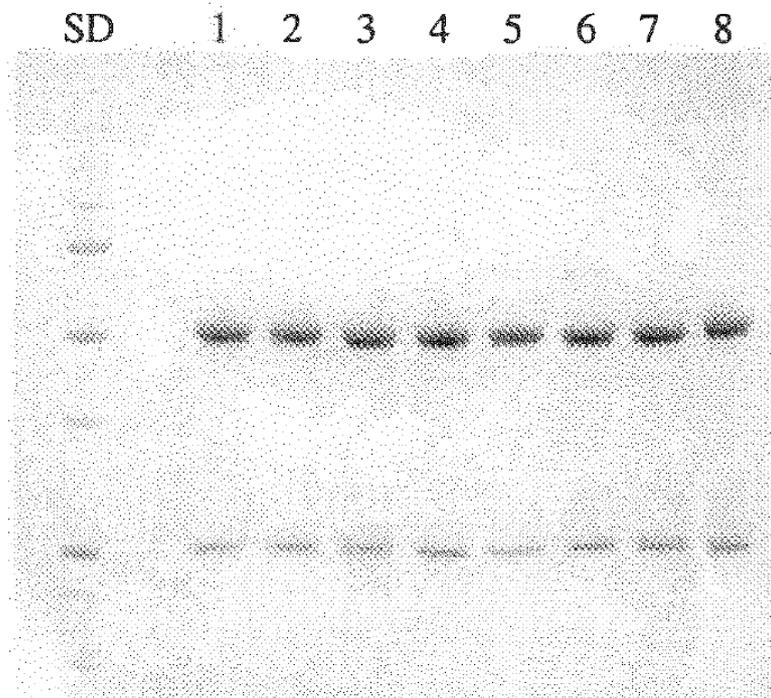


FIGURA 8c

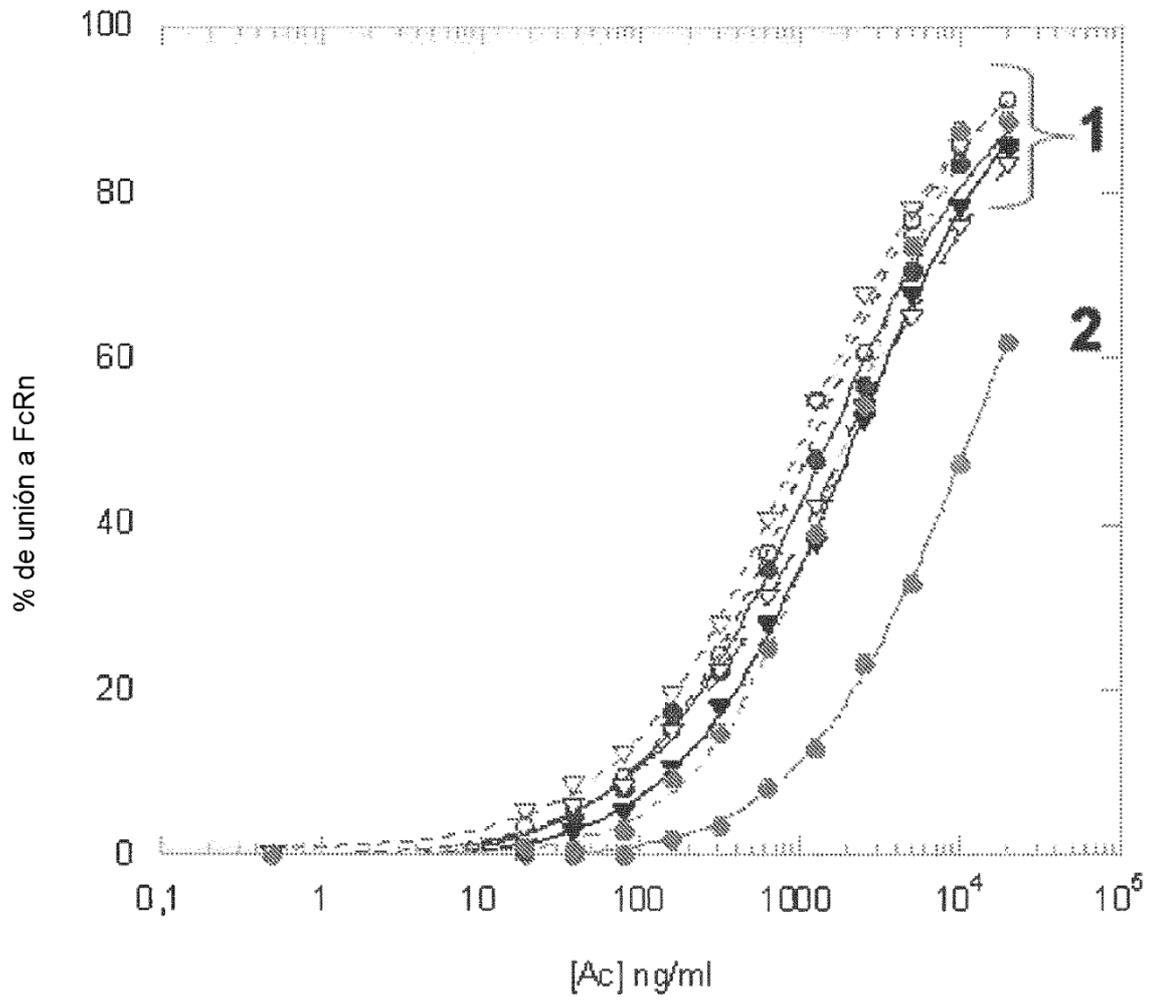


FIGURA 9

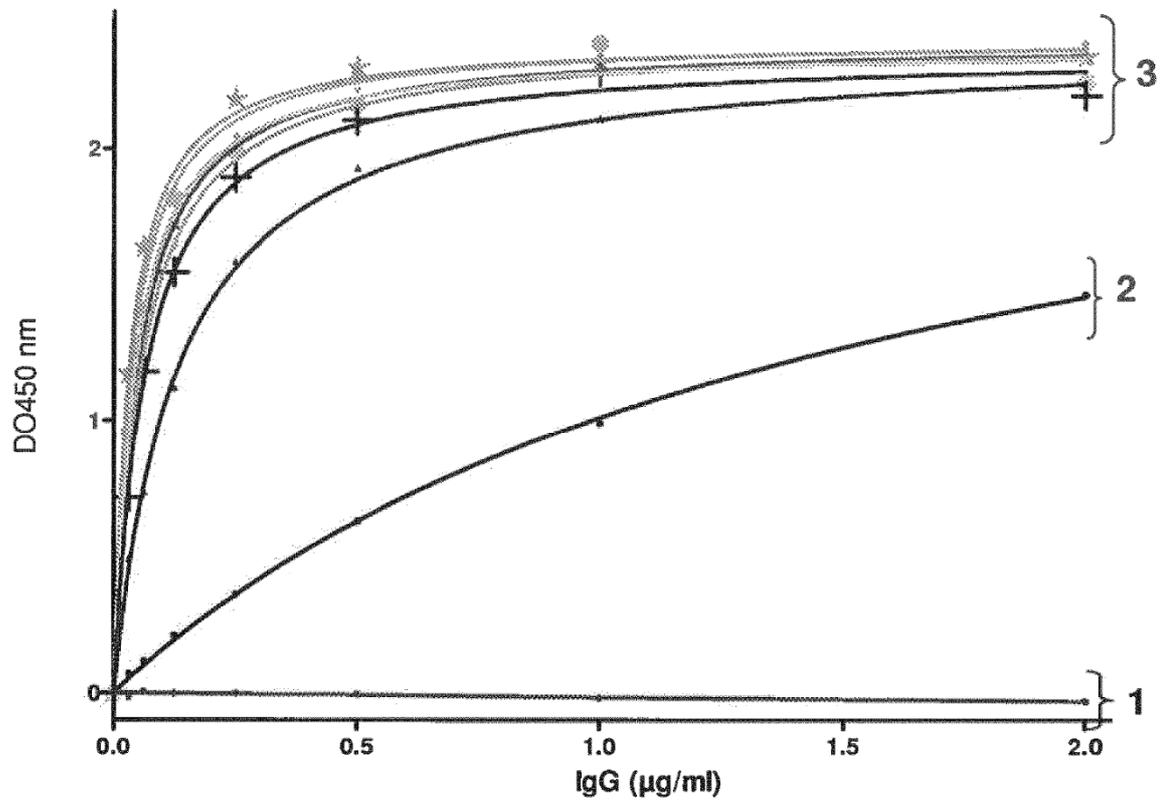


FIGURA 10

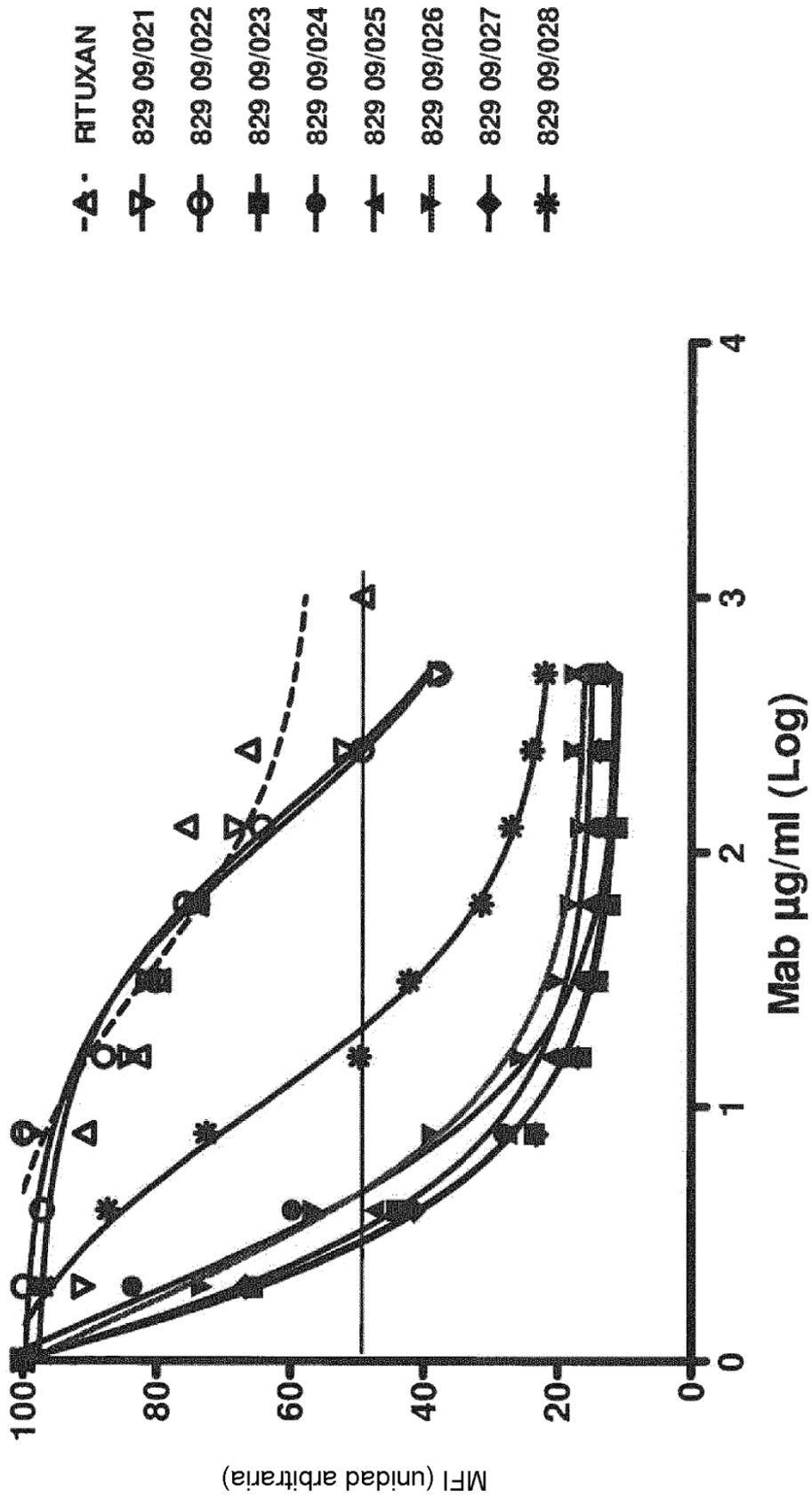


FIGURA 11

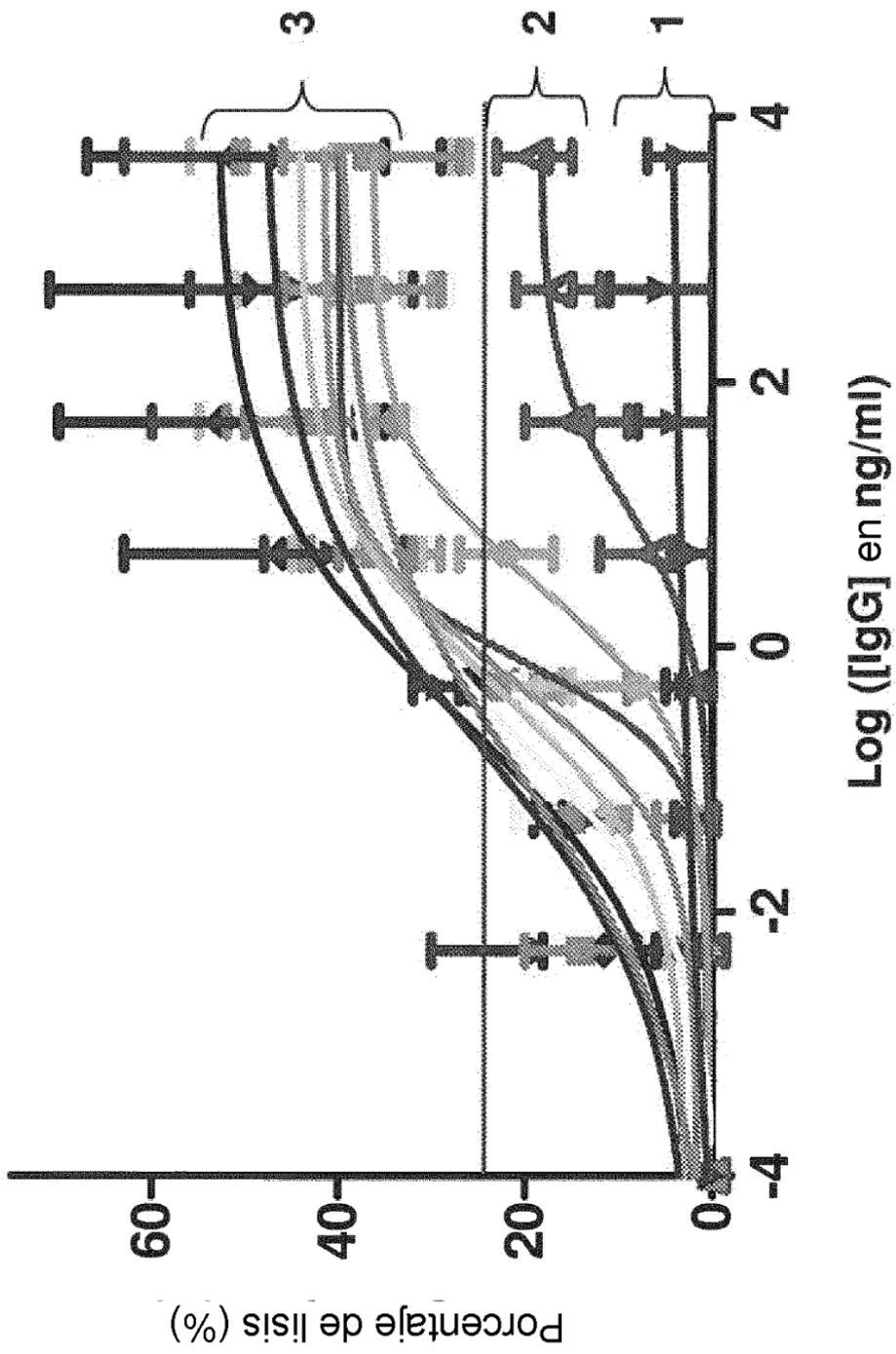


FIGURA 12