

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 268**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008 E 14171372 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2808343**

54 Título: **Variantes de Fc con unión alterada a FcRn**

30 Prioridad:

26.12.2007 US 16793 P

25.02.2008 US 31353 P

18.04.2008 US 46353 P

02.05.2008 US 50172 P

10.07.2008 US 79779 P

22.09.2008 US 99178 P

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

13.02.2020

73 Titular/es:

XENCOR, INC. (100.0%)

111 W. Lemon Avenue

Monrovia, CA 91016, US

72 Inventor/es:

CHAMBERLAIN, AARON;

DAHIYAT, BASSIL;

DESJARLAIS, JOHN RUDOLPH;

KARKI, SHER BAHADUR y

LAZAR, GREGORY ALAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 742 268 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de Fc con unión alterada a FcRn

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a variantes de inmunoglobulina IgG optimizadas, a métodos de ingeniería para su generación, y a su aplicación, particularmente con fines terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras. Cada cadena está compuesta por dominios de inmunoglobulinas (Ig), y por tanto, el término genérico de inmunoglobulina se emplea para tales proteínas. Cada cadena está compuesta por dos regiones diferentes, referidas como las regiones variable y constante. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos, y son responsables de la unión a varias proteínas naturales para incitar a eventos bioquímicos importantes. En los seres humanos hay cinco clases de anticuerpos que incluyen la IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases 15 IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), e IgM. La característica diferencial entre estas clases de anticuerpos está en sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias sutiles en la región V. Los anticuerpos IgG son proteínas tetraméricas compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada de IgG está compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, en referencia al dominio variable de la cadena pesada, dominio constante 1 de cadena pesada, dominio constante 2 20 de cadena pesada, y dominio constante 3 de cadena pesada respectivamente (también referido como VH-Cy1-Cy2-Cy3, en referencia al dominio variable de cadena pesada, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2, y dominio constante gamma 3 respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al C en el orden VL-CL, en referencia al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera respectivamente.

25 En IgG, un sitio en Fc entre los dominios Cy2 y Cy3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, cuya unión recicla el anticuerpo sometido a endocitosis del endosoma de nuevo a la corriente sanguínea (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766). Este proceso, acoplado con el impedimento de la filtración renal debida al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado vidas medias séricas del anticuerpo favorables que varían de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también juega un papel clave en el transporte del anticuerpo. El sitio de unión en Fc para FcRn también es el 30 sitio en el que se unen las proteínas bacterianas A y G. La unión firme por estas proteínas se explota normalmente como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de las proteínas. Por tanto, la fidelidad de esta región en Fc es importante tanto para las propiedades clínicas del anticuerpo como su purificación. Las estructuras disponibles del complejo Fc/FcRn de rata (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877), y de los complejos de Fc con las proteínas A y G (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20:2361-2370; Sauer-Eriksson et al., 1995, Structure 3:265-278; Tashiro et al., 1995, Curr Opin Struct Biol 5:471-481), proporcionan conocimiento sobre la interacción de Fc con estas proteínas. El receptor FcRn también es responsable de la transferencia de IgG al intestino neonatal y al lumen del epitelio intestinal en los adultos (Ghetie y Ward, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18:739-766; Yoshida et al., Immunity, 2004, 20(6):769-783). Los estudios de los dominios Fc de rata y humanos han demostrado la importancia de algunos 40 restos de Fc para la unión de FcRn. Las secuencias de rata y humanas tienen aproximadamente 64% de identidad de secuencia en las regiones Fc (restos 237-443 en la numeración del índice EU). Véanse las figuras 3, 4, y 5 para los alineamientos de rata/humano de Fc, cadena pesada de FcRn, y cadena ligera de FcRn (beta-2-microglobulina). Se ha construido un modelo del complejo Fc/FcRn humano a partir de la estructura existente del complejo Fc/FcRn de rata (Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877). Las secuencias de rata y humana comparten algunos restos que son críticos para la unión a FcRn, tales como H310 y H435 (Medesan et al., 1997 J. Immunol. 158(5):221-7; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604). En muchas posiciones, sin embargo, las proteínas humana y de rata tienen diferentes aminoácidos, proporcionando los restos en la secuencia humana diferentes entornos, y posiblemente diferentes identidades, que en la secuencia de rata. Esta variabilidad limita la capacidad para transferir 50 características de un homólogo al otro homólogo. En la Fc murina, la mutación aleatoria y la selección por exposición in fago en los sitios, T252, T254, y T256 dio lugar a un triple mutante, T252L/T254S/T256F, que tiene un incremento de 3,5 veces en la afinidad por FcRn y un incremento de 1,5 veces en la vida media sérica (Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15(7): 637-640). La disrupción de la interacción Fc/FcRn por mutaciones en las posiciones 253, 310 y 435 también dio lugar a una vida media in vivo disminuida (Medesan et al J. Immunol. 1997 158(5):2211-7).

55 Se han realizado estudios mutacionales en Fc γ humano en algunos de los restos que son importantes para la unión a FcRn y han demostrado una vida media sérica incrementada. En Fc γ 1 humano, Hinton et al. mutaron tres restos individualmente a los otros 19 aminoácidos comunes. Hinton et al., encontraron que algunos mutantes puntuales un doble mutante incrementaron la afinidad de unión de FcRn (Hinton et al., 2004, J. Biol.Chem. 279(8): 6213-6216. Hinton et al. Journal of Immunology 2006, 176:346-356). Dos mutaciones tuvieron vidas medias incrementadas en

monos. Shields et al. mutaron restos, casi exclusivamente a Ala, y estudiaron su unión a FcRn y los FcγR (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604).

5 Dall' Acqua et al. usaron exposición en fagos para seleccionar mutaciones de Fc que se unían a FcRn con afinidad incrementada (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180). Las secuencias de ADN seleccionadas fueron principalmente mutantes dobles y triples. La referencia expresó las proteínas codificadas por muchas de sus secuencias seleccionadas y encontraron algunas que se unían a FcRn más fuertemente que Fc de tipo salvaje.

10 La administración de anticuerpos y proteínas de fusión Fc como terapéuticos requiere inyecciones con una frecuencia prescrita respecto a las características de aclaramiento y vida media de la proteína. Las vidas media más largas *in vivo* permiten inyecciones menos frecuentes o dosificación menor, lo que es claramente ventajoso. Aunque las mutaciones anteriores en el dominio Fc han dado lugar a algunas proteínas con afinidad de unión incrementada a FcRn y vidas medias incrementadas *in vivo*, estas mutaciones no han identificado las mutaciones óptimas y vida media aumentada *in vivo*.

15 Una característica de la región Fc es la N glicosilación conservada que se produce en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como se refiere algunas veces, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales por lo que los anticuerpos tienen que ser producidos mediante el uso de sistemas de expresión de mamíferos. Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539-45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133-147; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477; y Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979-989).

20 Se han desarrollado anticuerpos para uso terapéutico. Publicaciones representativas relacionada a tales terapias incluyen Chamow et a., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200, Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410, McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16:2825-2833, y Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17:2639-2648. Actualmente en la terapia anticancerosa, cualquier pequeña mejora en los índices de mortalidad define el éxito. Determinadas variantes de IgG descritas en la presente memoria mejoran la capacidad de los anticuerpos para limitar además el crecimiento o destruir al menos parcialmente, las células cancerosas diana.

25 La potencia anti-tumoral de los anticuerpos es a través de su capacidad para mediar las funciones efectoras citotóxicas. Tales como las ADCC, ACDP, y CDC. Ejemplos incluyen Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci EE.UU 95:652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6:443-446 y Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758.

30 La inmunoglobulina IgG1 es el anticuerpo más empleado normalmente con fines terapéuticos y la mayoría de los estudios de ingeniería se han construido en este contexto. Sin embargo, los diferentes isotipos de la clase IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, tienen propiedades físicas, biológicas, y clínicas, únicas. Existe una necesidad en la técnica de diseñar variantes mejoradas de IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. Existe otra necesidad de diseñar tales variantes para mejorar la unión a FcRn y/o incrementar la vida media *in vivo* en comparación con los polipéptidos IgG nativos. Además, existe una necesidad de combinar variantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas con variantes que comprenden modificaciones para mejorar la eficacia a través de la unión alterada a Fcγ₁. La presente solicitud conoce estas y otras necesidades.

US2006173170 se refiere a métodos de ingeniería de inmunoglobulinas IgG optimizadas.

40 **Compendio de la invención**

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una variante Fc de un polipéptido Fc IgG humano, en donde dicha variante Fc comprende 428L y 434S, en donde dicha variante Fc muestra un aumento de la unión a FcRn en comparación con el polipéptido Fc IgG humano, y en donde la numeración es según el índice EU de Kabat.

45 En una realización dicho polipéptido Fc IgG humano se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.

En una realización dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG1.

En una realización dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG2.

En una realización dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG4.

50 En una realización dicha variante Fc de un polipéptido Fc IgG humano es un anticuerpo de cadena pesada.

En una realización dicha variante Fc de un polipéptido Fc IgG es una Fc de fusión.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una variante Fc de un polipéptido Fc humano, donde dicho Fc comprende 428L y 434S, en donde dicha variante muestra una unión a FcRn incrementada en comparación con dicho polipéptido Fc IgG humano, y en donde la enumeración es según el índice EU de Kabat.

5 En un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico del aspecto de la invención anteriormente mencionado.

En un aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico del aspecto anteriormente mencionado de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión del aspecto anteriormente mencionado de la invención.

10 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Alineamientos de secuencia de cadenas pesadas constantes de IgG humana. El gris indica las diferencias entre la IgG1, y los restos en el recuadro indica variaciones alotípicas comunes en la población humana.

Figura 2. (SEQ ID NO: 1-6) Secuencias de aminoácidos de regiones constantes empleadas en la invención.

Figura 3. (SEQ ID NO: 7-12) Secuencias de aminoácidos de ejemplos de regiones constantes variantes.

15 Figura 4. (SEQ ID NO: 13-22) Secuencias de aminoácidos de regiones variables VH y VL empleadas en la invención.

Figura 5. (SEQ ID NO: 23-29) Secuencias de aminoácidos de ejemplos de anticuerpos variantes.

20 Figura 6. Unión relativa a VEGF por WT y los anticuerpos anti-VEGF IgG1 de las variantes seleccionadas. El gráfico muestra las unidades de respuesta (RU) Biacore al final de la fase de asociación para unir el anticuerpo analito al antígeno VEGF inmovilizado.

Se empleó al anticuerpo anti-Her2 IgG1 como control negativo.

Figura 7. Sensogramas Biacore de anticuerpos WT y de variantes de IgG1 para FcRn humano inmovilizado a pH bajo (6,0) y alto (7,4).

25 Figura 8. Afinidades de unión a FcRn de anticuerpos WT y de variantes de IgG1 para FcRn humano a pH 6,0 como se determina por Biacore. La gráfica muestra una trama de la constante de pseudo-afinidad (K_a^*) sobre una escala log.

30 Figura 9. Unión relativa de los anticuerpos anti-VEGF variantes de IgG1 para FcRn humano como se determina por Biacore. La tabla muestra el nº de veces de la K_a^* para cada variante relativo a la IgG1 humana WT (nativa). n indica la cantidad de tiempo de cada variante que se ensayó, y la Media y SD indican la media y la desviación estándar respectivamente para cada variante a lo largo de los n experimentos de unión. El nº de veces de unión a FcRn se calculó para todas las variantes relativas a IgG1 WT dentro de cada experimento de unión respectivo. NB indica que no se detectó unión. ND indica que la unión no se determinó para esa variante particular. NF indica que el ajuste no fue posible a partir de los datos de unión.

35 Figura 10. Unión relativa de anticuerpos anti-VEGF de la variante IgG2 y IgG1/2 para FcRn humano como se determina por Biacore. La tabla es como se describe en la Figura 9.

40 Figura 11. Análisis de combinaciones de sustitución aditiva y sinérgica. La Figura 11a muestra una gráfica del número de veces de la unión a FcRn humano determinado experimentalmente para cada una de las variantes frente al número de veces de unión a FcRn predicha como se determina por el producto de las variantes en solitario. Los puntos de datos de las variantes están marcados, y la línea representa aditividad perfecta. La Figura 11b muestra la diferencia entre el nº de veces experimental y la predicha para cada variante de combinación. La Figura 11c muestra la sinergia de cada combinación de variantes. El % de sinergia se calculó como $100 \times [(n^\circ \text{ de veces de unión experimental} / n^\circ \text{ de veces de unión predicha}) - 1]$.

Figura 12. Unión relativa de anticuerpos de variantes anti-TNF, -CD25, -EGFR, y -IgE FcRn humano como se determina por Biacore. La tabla es como se describe en la Figura 9.

45 Figura 13. Farmacocinéticas in vivo de anticuerpos WT y de variantes en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. Las gráficas marcan la concentración sérica de anticuerpo frente al tiempo después de una dosis intravenosa única. La Figura 13a muestra los datos de uno de los 4 estudios llevados a cabo con anticuerpos IgG1 (Estudio 3), y la Figura 13b muestra los datos de un estudio llevado a cabo con anticuerpos IgG2 (Estudio 5).

50 Figura 14. Parámetros PK a medida para todos los estudios PK in vivo llevados a cabo en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺ con anticuerpos WT y variantes. Datos proporcionados para los parámetros PK, n representa el número de ratones

por grupo, con la Media y la desviación estándar (SD). La vida media representa la fase beta que caracteriza la eliminación del anticuerpo a partir del suero. Cmax es la concentración sérica máxima observada, AUC es el área bajo la curva del tiempo de concentración, y el aclaramiento, que representa el aclaramiento del anticuerpo a partir del suero. La vida media se calcula como la vida media de la variante de anticuerpo a lo largo de la IgG1 o IgG2 parental dentro de cada estudio.

Figura 15. Correlación entre la vida media de anticuerpos variantes de IgG1 (Figura 15a) y IgG2 (Figura 15b) en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺ y nº de veces de unión a FcRn relativa para IgG1 WT. Los datos en el eje y son de la Figura 14, y los datos en el eje x son de las Figuras 9 y 10. Las variantes seleccionadas están marcadas, y los datos de las variantes de los experimentos repetidos están en círculos. La Figura 15c muestra ambos datos de correlación para IgG1 y IgG2, con las líneas en negro y gris representando los ajustes de los datos de IgG1 y IgG2 respectivamente.

Figura 16. (SEQ ID NO: 30-35). Secuencias de aminoácidos de inmunoadhesinas de Fc anti-TNF variantes y parentales en la invención.

Figura 17. Unión de inmunoadhesinas anti-TNF al antígeno TNF como se determina por Biacore.

Figura 18. Unión relativa de inmunoadhesinas Fc variantes para FcRn humano como se determina por Biacore. La tabla muestra el nº de veces de la Ka* de cada variante relativa para la IgG1 WT (nativa) humana. n indica la cantidad de tiempo de cada variante que se estudió, y la Media y SD indican la media y la desviación estándar respectivamente para cada variante a lo largo de los n experimentos de unión. El nº de veces de FcRn se calculó para todas las variantes relativas a IgG parental dentro de cada experimento de unión respectivo.

Figura 19. Farmacocinéticas in vivo de las inmunoadhesinas Fc variantes y parentales en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. Las gráficas marcan la concentración sérica de Fc frente al tiempo después de una dosis intravenosa única.

Figura 20. Parámetros PK a mediada a partir de un estudio PK in vivo de fusión de Fc en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. Los parámetros son como se describe en la Figura 14. El % de incremento en la vida media se calcula como 100 veces la vida media de la variante de fusión Fc sobre la de IgG1 WT o IgG2 parental.

Figura 21. Unión relativa de anticuerpos anti-VEGF de variante IgG1 a FcRn de mono cynomolgus y humano como se determina por Biacore. La Figura 21a muestra los datos en forma tabular. La descripción de la figura es como en la Figura 9, y los datos para la unión a FcRn humano se toman de la Figura 9. La Figura 21b muestra un gráfico de los datos.

Figura 22. Farmacocinéticas in vivo de anticuerpos WT y variantes en monos cynomolgus. Las gráficas marcan la concentración sérica del anticuerpo frente al tiempo después de una dosis intravenosa única.

Figura 23. Parámetros PK ajustados a partir del estudio PK in vivo en monos cynomolgus con anticuerpos WT y variantes. Los parámetros son como se describe en la Figura 14.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe la generación de nuevas variantes de dominios Fc, incluyendo las encontradas en anticuerpos, fusiones de Fc, e inmuno-adhesiones, que tienen una unión incrementada al receptor FcRn. Como se indica en la presente memoria, la unión a FcRn resulta en una retención *in vivo* en suero más larga.

Con el fin de incrementar la retención *in vivo* de las proteínas Fc, el incremento en la afinidad de unión debe ser alrededor de pH 6 mientras se mantiene una afinidad más baja alrededor de pH 7,4. Aunque todavía se está examinando, se cree que las regiones Fc tienen vidas medias más largas *in vivo*, porque la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma secuestra el Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12):592-598). El compartimento endosomal recicla entonces el Fc a la superficie celular. Una vez se abre el compartimento al espacio extracelular, el mayor pH, -7,4, induce la liberación de Fc de nuevo a la sangre. En ratones, Dall' Acqua et al. mostraron que los mutantes Fc con unión incrementada a FcRn a pH 6 y pH 7,4 tenían realmente concentraciones séricas reducidas y la misma vida media que el Fc de tipo salvaje (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180). La afinidad incrementada de Fc para FcRn a pH 7,4 se piensa que impide la liberación del Fc de nuevo a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones en Fc que incrementarán la vida media de Fc *in vivo* incrementarán idealmente la unión a FcRn al pH menor mientras todavía permiten la liberación de Fc a pH mayor. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el intervalo de pH de 6,0 a 7,4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar restos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn (Figura 6.).

Un aspecto adicional de la invención es el incremento en la unión a FcRn sobre el tipo salvaje específicamente a pH menor, aproximadamente pH 6,0, para facilitar la unión Fc/FcRn en el endosoma. También se describen variantes de Fc con unión alterada a FcRn y unión alterada a otra clase de receptores de Fc, los FcγR (algunas veces escritos como FcγRα) ya que se ha demostrado que la unión diferencial a FcγR, particularmente unión incrementada a FcγRIIb y unión disminuida a FcγRIIb, da como resultado un aumento de la eficacia.

Definiciones

Con el fin de que la solicitud pueda entenderse más completamente, se muestran a continuación varias definiciones. Se pretende que dichas definiciones engloben equivalentes gramaticales.

- 5 Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" como se emplea en la presente memoria se destina a la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y que posteriormente causan la lisis de la célula diana.
- Por "ADCP" o "fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos" como se emplea en la presente memoria se destina a la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.
- 10 Por "modificación" en la presente memoria se destina a una sustitución, inserción, y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica o una alteración en una fracción unida químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o una estructura PEG unida a una proteína. Por "modificación de aminoácidos" en la presente memoria se destina a una sustitución, inserción, y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica.
- 15 Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en la presente memoria se destina al reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se reemplaza por tirosina.
- Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" como se emplea en la presente memoria se destina a la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, -233E o ^233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o ^233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.
- 20 Por "delección de aminoácidos" o "delección" como se emplea en la presente memoria se destina a la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, E233-o E233# designa una delección de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una delección de la secuencia GluAspAla que empieza en la posición 233.
- 25 Por "proteína variante" o "variante de proteína", o "variante" como se emplea en la presente memoria se destina a una proteína que se diferencia de una proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Variante de proteína puede referirse a la proteína en sí misma, a una composición que comprende la proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferiblemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos comparada con la proteína parental, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente setenta modificaciones de aminoácidos y preferiblemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparado con la parental. La secuencia de la variante de proteína en la presente memoria poseerá preferiblemente al menos aproximadamente el 80% de homología con la secuencia de la proteína parental, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de homología, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. La proteína variante se puede referir como a la variante de la proteína en sí misma, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a una secuencia de ADN que la codifica. Por consiguiente, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se emplea en la presente memoria se destina a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido,
- 30 "variante de IgG" o "IgG variante" como se emplea en la presente memoria se destina a un anticuerpo que difiere de una IgG en virtud de al menos una modificación de aminoácido, y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante" como se emplea en la presente memoria se destina a una secuencia de inmunoglobulina que difiere de esta en una secuencia de inmunoglobulina parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "Variante Fc" o "Fc variante" tal y como se emplea en la presente memoria se quiere decir una proteína que se diferencia de una proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Variante de proteína puede referirse a la proteína en sí misma, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Por consiguiente, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se emplea en la presente memoria se quiere decir un anticuerpo que se diferencia de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, "variante de IgG" o "IgG variante" como se emplea en la presente memoria quiere decir un anticuerpo que se diferencia de una IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante" como se emplea en la presente memoria quiere decir una secuencia de inmunoglobulina que se diferencia de una secuencia de inmunoglobulina parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. "Fc variante" o "variante de Fc" como se emplea en la presente memoria significa una proteína que comprende una modificación en un dominio Fc.
- 35 Las variantes de Fc de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Por tanto, por ejemplo, N434S o 434S es una variante de Fc con la sustitución de serina en la posición 434 en relación al polipéptido Fc parental, en donde la numeración es según el índice EU. Asimismo, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S respecto al polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT puede no especificarse, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se refiere como

428L/434S. Cabe señalar que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que M428L/N434S, y así sucesivamente. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es según el índice EU. El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 63:78-85.) La modificación puede ser una adición, delección, o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Las variantes pueden comprender aminoácidos no naturales. Los ejemplos incluyen US 6,586,207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS Estados Unidos de América 99:11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10.

"Proteína" como se emplea en la presente memoria significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptídico puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992)). Los aminoácidos pueden ser naturales o no naturales; como apreciarán los expertos en la técnica. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, y norleucina se consideran aminoácidos para los propósitos de la invención, y pueden utilizarse aminoácidos configurados en D y L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz et al., incluyendo pero no limitado a los métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadenas laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, conectores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios de proteínas, y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por "resto" como se emplea en la presente memoria significa una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, Asparagina 297 (también referida como Asn297, también referida como N297) es un resto en el anticuerpo IgG1 humano.

Por "Fab"o "región Fab" como se emplea en la presente memoria significa el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL, y CL. Fab puede referirse a esta región aisladamente, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fab.

Por "modificación de subclase de IgG" como se emplea en la presente memoria significa una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo IgG diferente, alineado. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG.

Por "modificación no natural" como se emplea en la presente memoria significa una modificación de aminoácidos que no es isotópica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende serina en la posición 434S, la sustitución 434S en IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 se considera una modificación no natural.

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos" como se emplea en la presente memoria significa uno de los 20 aminoácidos naturales o cualesquiera análogos no naturales que pueden estar presentes en una posición específica definida.

Por "función efectora" como se emplea en la presente memoria se refiere a un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no están limitadas a ADCC, ADCP, y CDC.

Por "ligando de Fc de IgG" como se emplea en la presente memoria significa una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo Fc / ligando de Fc. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a FcγRs, FcγR, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estafilocócica, y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcγRs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los ligandos particulares de Fc de IgG son FcRn y receptores gamma Fc. Por "ligando de Fc" como se emplea en la presente memoria se destina a una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc / ligando de Fc.

Por "receptor gamma de Fc", "FcγR" o "FcγR" como se emplea en la presente memoria se destina a cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada por un gen FcγR. En los seres humanos, esta familia incluye pero no se limita a FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los halotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los halotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los halotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65, incorporado completamente por referencia), así como cualquier FcγR humano no

descubierto o isoformas o halotipos de FcγR. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los FcγR de ratón incluyen pero no se limitan a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR de ratón no descubierto o isoformas o halotipos de FcγR.

- 5 Por "FcRn" o "receptor neonatal de Fc" como se emplea en la presente memoria se destina a una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede ser de cualquier organismo, que incluye pero no se limita a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, referidos frecuentemente como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen FcRn. A no ser que se indique lo contrario en la presente memoria, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. Las secuencias de interés particular de FcRn se muestran en las Figuras, particularmente las especies humanas.

- 15 Por "polipéptido parental" como se emplea en la presente memoria se destina a un polipéptido no modificado que posteriormente se modifica para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión obtenida por ingeniería de un polipéptido natural. Polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "inmunoglobulina parental" como se emplea en la presente memoria se destina a un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo parental" como se emplea en la presente memoria se destina a un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe señalarse que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos comerciales conocidos, producidos recombinantemente como se resalta más adelante.

Por "posición" como se emplea en la presente memoria se destina a una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo el índice EU para enumerar anticuerpos.

- 25 Por "antígeno diana" como se emplea en la presente memoria se destina a la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido, u otro compuesto químico.

Por "célula diana" como se emplea en la presente memoria se destina a una célula que expresa un antígeno diana.

- 30 Por "región variable" como se emplea en la presente memoria se destina a la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes VK, Vλ, y/o VH que componen los loci genéticos de la cadena kappa, lambda, y pesada, respectivamente, de una inmunoglobulina.

Por "de tipo salvaje o WT" en la presente memoria se destina a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionalmente.

- 35 La presente invención está dirigida a anticuerpos que presentan unión moduladora incrementada a FcRn en relación al anticuerpo de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunos casos, la unión incrementada da como resultado el reciclado celular del anticuerpo y, por lo tanto, una vida media incrementada. Además, los anticuerpos que presentan unión incrementada a FcRn y unión alterada a otros receptores Fc, por ejemplo FcγRs, encuentran uso en la presente invención.

40 Anticuerpos

La presente solicitud está dirigida a anticuerpos que incluyen modificaciones de aminoácidos que modulan la unión a FcRn. Son particularmente interesantes los anticuerpos que comprenden mínimamente una región Fc, o una variante funcional de ésta, que presenta afinidad de unión incrementada para FcRn a pH disminuido, y que no presentan una unión sustancialmente alterada a pH mayor.

- 45 Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden normalmente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto normalmente por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, cada pareja tiene una cadena "ligera" (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, y IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitado a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitado a, IgM1 e IgM2. Así, "isotipo" como se emplea en la presente memoria significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de inmunoglobulina humana son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

- 55 La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable del reconocimiento del antígeno. En la región variable, se agrupan tres bucles para cada

uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se refiere como una región determinante de la complementariedad (aquí en lo sucesivo referido como una "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa.

5 La parte carboxilo 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 de cadenas ligeras. En base del grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en la CDR y la estructura e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, NIH publication, N° 91-3242, E.A. Kabat et al.).

10 En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente memoria significa una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. Son de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada, incluyendo, los dominios constantes pesados (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son como sigue: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 según el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 según el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat.

15 Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" en la presente memoria significa el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el resto EU posición 237. Por tanto, para IgG la bisagra del anticuerpo se define en la presente memoria para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra menor, con la "bisagra menor" refiriéndose generalmente a las posiciones 226 ó 230.

20 De interés particular en la presente invención son las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc", como se emplea en la presente memoria significa el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD, e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE y IgM, y la bisagra flexible N-terminal para a estos dominios. Para IgA y IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, como se ilustra en la Figura 1, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cg2 y Cg3) y la región bisagra menor entre Cgamma1 (Cg1) y Cgamma2 (Cg2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para incluir los restos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región aisladamente, o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe más adelante. Por "polipéptido Fc" como se emplea en la presente memoria significa un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fc aislados, y fragmentos de Fc.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" en la presente memoria significa la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variable y constante, incluyendo una o más modificaciones como se resalta en la presente memoria.

30 Alternativamente, los anticuerpos pueden tener una variedad de estructuras, incluyendo, pero no se limita a, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces referidos en la presente memoria como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces referidas como "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

35 **Fragmentos de Anticuerpo**

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. De particular interés son los anticuerpos que comprenden regiones Fc, fusiones Fc, y la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra-CH2-CH3), de nuevo incluyendo también fusiones de región pesada constante.

40 Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, pero no se limitan a, (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) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consiste en una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un enlace peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) Fv de cadena única biespecífico (WO 03/11161, incorporada por la presente por referencia) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpo pueden estar modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245).

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

5 En algunas realizaciones, los componentes de soporte pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, si la proteína es un anticuerpo, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a los anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden normalmente una región o regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano. Los "anticuerpos humanizados" se refieren generalmente a anticuerpos no humanos en los que se han cambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto en sus CDR. Las CDR, algunas de las cuales están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en la estructura lámina beta de una región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad se determina por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. La "retromutación" de restos de estructura aceptores seleccionados a restos dadores correspondientes se requiere frecuentemente para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana, y por tanto, comprenderá habitualmente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse usando ratones con un sistema inmune modificado mediante ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, incorporado en su totalidad mediante referencia. En la técnica se conoce una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos (Véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE.UU.), y las referencias citadas en ella). 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; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, U.S.A. 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160:1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res.57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de modificación de superficie, como se describe por ejemplo en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:969-973. En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Se pueden emplear métodos basados en la estructura para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describen en USSN 11/004.590. Se pueden emplear métodos en base a la selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables, que incluyen pero no se limitan a los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem.272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37):22611-22618; Rader et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de sólo de partes de las CDRs, que incluyen pero no se limitan a los métodos descritos en USSN 09/810.510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084.

Anticuerpos Biespecíficos

45 En una realización, los anticuerpos de la invención anticuerpo multiespecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, también referido a veces como "fragmentos divalentes". Éstos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los fragmentos divalentes pueden fabricarse de una variedad de maneras conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449), por ejemplo, pueden prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos.

50 Minicuerpos

En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas semejantes 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 puede unirse a la región Fc, y puede incluir parte o la región bisagra completa.

Fusiones de Anticuerpo

55 En una realización, los anticuerpos de la invención son proteínas de fusión de anticuerpo (referidas algunas veces en la presente memoria como un "conjugado de anticuerpo"). Un tipo de fusiones de anticuerpo comprende fusiones Fc, que unen la región Fc con una pareja de conjugado. Por "fusión de Fc" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una proteína en la que uno o más polipéptidos están unidos de manera operativa a una región Fc. Fusión Fc en la presente memoria quiere que sea sinónimo con los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig",

"quimera de Ig", y "globulina receptor" (algunas veces con guiones) tal y como se usa en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión de Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con una pareja de fusión, que en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no están limitadas a, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión que son moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirige la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, que está implicada en enfermedad. Así, las variantes de IgG pueden unirse a una o más parejas de fusión. En una realización alternativa, la variante de IgG se conjuga o se une de manera operativa a otro compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico puede ser un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radioisótopo, una citoquina, u otro agente terapéuticamente activo. La IgG puede unirse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilenglicol.

Además de las fusiones de Fc, las fusiones de anticuerpo incluyen la fusión de la región constante de la cadena pesada con una o más parejas de fusión (de nuevo incluyendo la región variable de cualquier anticuerpo), mientras otras fusiones de anticuerpo son sustancial o completamente anticuerpos de longitud completa con parejas de fusión. En una realización, un papel de la pareja de fusión es mediar la unión a la diana, y por tanto, es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo (y de hecho pueden ser). Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc (o fusión de anticuerpo). Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión que son moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirige la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, que está implicada en la enfermedad.

La pareja del conjugado puede ser proteinácea o no proteinácea; generándose la última generalmente usando grupos funcionales en el anticuerpo y en la pareja del conjugado. Por ejemplo, en la técnica se conocen enlazadores; por ejemplo, enlazadores homo o hetero-bifuncionales como se conoce bien (véase, 1994 catálogo de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre agentes de entrecruzamiento, páginas 155-200).

Conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, marcadores como se describe más adelante, fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, pero no se limita a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de dichas toxinas. Toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen radioquímicos preparados por conjugación de radioisótopos a anticuerpos, o uniendo un radionúclido a un agente quelante que se ha unido covalentemente al anticuerpo. Realizaciones adicionales utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, y duocarmicinas y análogos; para los últimos, véase U.S. 2003/0050331A1.

Modificaciones covalentes de Anticuerpos

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen en el alcance de esta invención, y se hacen, generalmente, pero no siempre, después de la traducción. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizador orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N o C terminales.

Lo más común es hacer reaccionar los restos cisteinil con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinil también se pueden derivatizar por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

Los restos histidil se derivatizan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidil. También es útil bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en 0,1M cacodilato de sodio a pH 6,0.

Los restos lisinil y amino terminales se hacen reaccionar con ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los restos lisinil. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los restos arginil se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina requiere que la reacción se

realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo épsilon-amino de arginina.

5 La modificación específica de restos tirosil puede hacerse, con interés particular en introducir marcadores espectrales en restos tirosil por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente. Los restos tirosil se yodan usando 1251 ó 1311 para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

10 Los grupos laterales carboxilo (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R'), en las que R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ó 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los restos aspartil y glutamil se convierten en restos asparaginil y glutaminil por reacción con iones amonio.

15 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para entrecruzar anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una variedad de métodos, además de los métodos descritos más adelante. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivatización tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rinden intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, se emplean matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las Pat. U.S. N^{os} 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, se incorporan todos en su totalidad mediante referencia, para la inmovilización de las proteínas.

20 Los restos glutaminil y asparaginil se desamidán frecuentemente a los restos glutamil y aspartil correspondientes, respectivamente. Alternativamente, estos restos se desamidán en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos restos se encuentra en el alcance de esta invención. Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos seril o treonil, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

30 Glicosilación

Otro tipo de modificación covalente es la glicosilación. En otra realización, las variantes de IgG descritas en la presente memoria pueden modificarse para incluir una o más glicofomas preparadas por ingeniería. Por "glicofoma preparada por ingeniería" como se emplea en la presente memoria significa una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una IgG, en donde dicha composición de carbohidrato se diferencia químicamente de la de una IgG parental. Las glicofomas preparadas por ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen pero no se limitan a aumentar o reducir la función efectora. Las glicofomas preparadas por ingeniería pueden generarse 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; US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1; (tecnología Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAB® tecnología de glicosilación por ingeniería genética [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectados que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, expresando una IgG en varios organismos o líneas celulares, preparada mediante ingeniería o de otra forma (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células de hibridoma YB2/0 de rata), regulando las 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 carbohidrato o los carbohidratos después de que se haya expresado la IgG. La glicofoma preparada por ingeniería se refiere normalmente al carbohidrato u oligosacárido diferente; por tanto, una variante de IgG, por ejemplo, un anticuerpo o fusión de Fc, puede incluir una glicofoma preparada mediante ingeniería. Alternativamente, la glicofoma preparada mediante ingeniería puede referirse a la variante de IgG que comprende el carbohidrato 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, discutido más adelante), como de la célula u organismo huésped en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se discuten más adelante.

55 La glicosilación de polipéptidos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tri-péptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tri-péptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o

60

xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina ó 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos que contiene una o más de las secuencias de tri-péptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse por la adición de, o sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación ligados a O). Para facilitararlo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de 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.

Otros medios para incrementar el número de fracciones de carbohidrato en el anticuerpo son por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento empleado, el azúcar o azúcares pueden unirse 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 WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

La eliminación de fracciones de carbohidrato presentes en el anticuerpo de partida puede conseguirse 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 mayor parte o de todos los azúcares excepto del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja el polipéptido intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de fracciones de carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse mediante el empleo de una variedad de endo y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en sitios de glicosilación potenciales puede evitarse mediante el empleo del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de las uniones proteína-N-glicósido.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a varios polímeros no proteínicos, que incluyen, pero no se limitan a, varios polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera mostrada, por ejemplo, en 2005-2006 Catálogo PEG de Nektar Therapeutics (disponible en la página de internet de Nektar) Patentes de EE.UU. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. Además, como se conoce en la técnica, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en varias posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase, por ejemplo, la Publicación U.S. N° 2005/0114037A1.

Anticuerpos Marcados

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. En algunos casos, éstos se consideran fusiones de anticuerpo. El término "grupo marcador" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y pueden usarse para llevar a cabo la presente invención.

En general, los marcadores se encuentran en una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) marcadores 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 par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores de epítipo, etc.). En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y pueden usarse para llevar a cabo la presente invención.

Los marcadores específicos incluyen marcadores ópticos, que incluyen, pero no se limitan a, cromóforos, sustancias fosforescentes y fluoróforos, siendo los últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser bien sustancias fluorescentes de "molécula pequeña", o sustancias fluorescentes proteínicas.

Por "marcador fluorescente" significa cualquier molécula que puede detectarse a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, Malaquita verde, estilbeno, Amarillo de Lucifer, Cascade BlueJ, Texas Rojo, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon verde, los tintes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-

ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina, y Texas Rojo (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Los agentes de tinción ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland.

5 Los marcadores fluorescentes proteináceos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde, incluyendo una especie de Renilla, *Ptilosarcus*, o *Aequorea* de GFP (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de acceso al Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8ª planta, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) y Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes U.S. N^{os} 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Variantes de IgG

15 En una realización, la invención proporciona proteínas IgG variantes. Como mínimo, las variantes de IgG comprenden un fragmento de anticuerpo que comprende la región CH2-CH3 de la cadena pesada. Además, las variantes de IgG adecuadas comprenden dominios Fc (por ejemplo, incluyendo la región bisagra menor), así como son también útiles en la presente invención las variantes de IgG que comprenden la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra-CH2-CH3), todas ellas pueden fusionarse con parejas de fusión.

20 Una variante de IgG incluye una o más modificaciones de aminoácidos respecto a un polipéptido IgG parental, en algunos casos respecto a la IgG de tipo salvaje. La variante de IgG puede tener una o más propiedades optimizadas. Una variante de IgG se diferencia en la secuencia de aminoácidos de su IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Por tanto, las variantes de IgG tienen al menos una modificación de aminoácidos comparadas con la parental. Alternativamente, las variantes de IgG pueden tener más de una modificación de aminoácidos comparadas con la parental, por ejemplo, de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, y lo más preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparadas con la parental.

25 Por tanto, las secuencias de las variantes de IgG y aquellas del polipéptido Fc parental son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias variantes de la IgG variante en la presente memoria poseerán aproximadamente 80% de homología con la secuencia variante de IgG parental, preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. Las modificaciones se pueden realizar genéticamente empleando biología molecular, o pueden se pueden realizar enzimática o químicamente.

Antígenos Diana para Anticuerpos

35 Prácticamente, cualquier antígeno puede ser diana de las variantes de IgG, que incluyen pero no se limita a, proteínas, subunidades, dominios, restos, y/o epítomos que pertenecen a la siguiente lista de antígenos diana, que incluye tanto factores solubles, tales como citoquinas, como factores unidos a membrana, incluyendo receptores transmembrana: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, Receptor de Adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPÁRTICO, factor natriurético Atrial, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, Osteogenina BMP-3, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor de complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/D/PPi, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCL, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, GMPC, CINC, Toxina de *Clostridium botulinum*, Toxina de *Clostridium perfringens*, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3,

CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, Factor
 acelerador de la degradación, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), Dhh, digoxina, DNAM-1, ADNasa, Dpp, DPPIV/CD26,
 Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina,
 5 Encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina1, EpCAM, Efrina B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor IIa, Factor
 VII, Factor VIIIc, Factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19,
 FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, Hormona estimuladora del folículo,
 Fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF,
 10 GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12,
 CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2,
 GFR-alfa3, GPCR, Glucagón, Glut4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, Factor liberador
 de la hormona del crecimiento, Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de cubierta de HCMV gB,
 HCMV) glicoproteína de cubierta gH, HCMV UL, Factor de crecimiento hematopoyético (HGF), Hep B gp120,
 heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína del virus del herpes simple (HSV)
 15 gB, glicoproteína de HSV gD, HGFA, Antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HIV
 gp120, HIV IIIB gp 120 V3 loop, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana,
 citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-
 3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-
 1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23,
 20 interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, Cadena A de insulina, Cadena B de insulina, factor de
 crecimiento similar a insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina
 alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1,
 integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6, Calicreína 11,
 Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR,
 25 Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1 Latente, TGF-1 bp1
 Latente, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, Antígeno Y de Lewis, Antígeno relacionado con Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo,
 LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Tensioactivo pulmonar, Hormona
 luteinizante, Receptor beta de Linfotóxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-
 CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK,
 30 MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-
 7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, Sustancia inhibidora mulleriana, Mug, MuSK,
 NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4, ó -6, Neurturina, Factor de
 crecimiento neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN,
 OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina,
 PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina
 35 placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Prolinsulina, Prolaxina, Proteína C, PS, PSA, antígeno de membrana
 específico de la próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de la
 relaxina, cadena B de la relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, Factores Reumatoides,
 RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINA, Albúmina sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI,
 40 SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (Glicoproteína 72 asociada a
 tumores), TARC, TCA-3, receptores de células T (por ejemplo, receptor de células T alfa/beta), Tdt, TECK, TEM1,
 TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina similar a PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TFF-Beta
 Específica General, TFG-Beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2,
 TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de timo, Hormona estimulante del tiroides, Tie, TIMP, TIQ,
 Factor Tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII,
 45 TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5 KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C
 (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R),
 TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R),
 TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18
 (GTR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60),
 50 TNFRSF1B, (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4
 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68,
 TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22
 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-
 1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 Ligando, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK Ligando ODF, Ligando OPG), TNFSF12
 55 (TWEAK Ligando Apo-3, Ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK,
 TNFSF20), TNFSF14 (Ligando LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (Ligando GTR Ligando
 AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC,
 p33), TNFSF4 (Ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (Ligando CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP),
 TNFSF6 (Ligando Fas Ligando Apo-1, Ligando APT1), TNFSF7 (CD27 Ligando CD70), TNFSF8 (CD30 Ligando
 60 CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1BB Ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2,
 TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno asociado a tumor CA 125, antígeno
 asociado a tumor que expresa carbohidrato relacionado con Y de Lewis, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1,
 Uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-Cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3
 (flt-4), VEGl, VIM, Antígenos virales, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor de von Willebrans, WIF-1, WNT1,
 65 WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, NT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A,

WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Un experto en la técnica reconocerá que la lista de dianas mencionada anteriormente se refiere no sólo a proteínas y biomoléculas específicas, sino también a la ruta o rutas bioquímicas que comprenden a las mismas. Por ejemplo, en referencia a CTLA-4 como un antígeno diana implica que los ligandos y receptores que constituyen la ruta co-estimuladora de células T, incluyendo a CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, y a cualquier otro ligando o receptor no descubierto que se unen a estas proteínas, también son dianas. Por tanto, diana como se emplea en la presente memoria se refiere no sólo a una molécula bioespecífica, sino al conjunto de proteínas que interaccionan con dicha diana y a los miembros de la ruta bioquímica a la que pertenece dicha diana. Un experto en la técnica reconocerá que cualquiera de los antígenos diana mencionados anteriormente, los ligandos o receptores que los unen, u otros miembros de su correspondiente ruta bioquímica, se pueden unir de manera operativa a variantes de Fc de la presente invención para generar una fusión Fc. Por tanto, por ejemplo, una fusión Fc que se dirige a EGFR se podría construir uniendo de manera operativa una variante de Fc a EGF, TGF- β o cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que se una a EGFR. Por consiguiente, una variante Fc de la presente invención se podría unir de manera operativa a EGF, TGF- β , o a cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que se una a EGFR. Por tanto, prácticamente cualquier polipéptido, bien o ligando, receptor, o alguna otra proteína o dominio de proteína, que incluyen, pero no se limitan a las dianas mencionadas anteriormente y las proteínas que componen sus correspondientes rutas bioquímicas, se pueden unir de manera operativa a las variantes Fc de la presente invención para desarrollar una fusión Fc.

La elección del antígeno adecuado depende de la aplicación deseada. Para el tratamiento anti-canceroso es deseable tener una diana cuya expresión sea restringida a células cancerosas. Algunas dianas que han demostrado ser especialmente susceptibles a la terapia de anticuerpos son aquellas con funciones de señalización. Otros anticuerpos terapéuticos ejercen sus efectos bloqueando la señalización del receptor mediante inhibición de la unión entre un receptor y su ligando análogo. Otro mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos es causar la regulación a la baja del receptor. Otros anticuerpos no funcionan mediante señalización a través de su antígeno diana. En algunos casos, se emplean anticuerpos que se dirigen frente a agentes de enfermedades infecciosas.

En otra realización, las variantes Fc de la presente invención se incorporan en un anticuerpo frente a una citoquina. Alternativamente, las variantes Fc se fusionan o conjugan a una citoquina. Por "citoquina" como se emplea en la presente memoria se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores celulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et al., 2001, *J Immunol Methods* 248:91-101, las citoquinas se pueden fusionar a un anticuerpo para proporcionar una serie de propiedades deseables. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están los factores de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, N-metilnil hormona de crecimiento humano, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores transformadores del crecimiento (TGFs) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta, y gamma; factores estimuladores de colinas (CSFs) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; C5a; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se emplea en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes activos biológicamente de las citoquinas de secuencia nativa.

Las citoquinas y las dianas solubles, tales como los miembros de la superfamilia THF, son dianas preferidas para el uso con las variantes de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, anti-CTLA-4, y anti-TNF, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos particularmente buenos para el uso de las variantes Fc que incrementan la unión FcRn. Agentes terapéuticos contra estas dianas están implicados frecuentemente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y requieren de inyecciones múltiples durante períodos largos de tiempo. Por lo tanto, se prefieren particularmente semividas séricas más largas y tratamientos menos frecuentes, proporcionado a partir de las variantes de la presente invención.

Varios anticuerpos de proteínas de fusión que están aprobados para su uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo, pueden beneficiarse de la presente invención. Estos anticuerpos y proteínas de fusión se refieren en la presente memoria como "productos y candidatos clínicos". Por tanto, en una realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente memoria pueden encontrar uso en una variedad de productos y candidatos clínicos. Por ejemplo, una serie de anticuerpos que se dirigen a CD20 se pueden beneficiar de polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente invención puede encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, US 5.736.137) un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para el tratamiento del linfoma de no Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente

desarrollado por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en US 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evoution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulado "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"). Varios anticuerpos que se dirigen a miembros diana de la familia de los receptores de factores de crecimiento epidérmico, que incluyen a EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), se pueden beneficiar de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase, por ejemplo, US 5.677.171), un anticuerpo anti-Her2/neu aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®) que está siendo desarrollado actualmente por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en US 4.753.894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (US 4.943.533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo quimérico anti-EGFR en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (US 6.235.883) que está siendo desarrollado actualmente por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (USSN 10/172.317), que está siendo desarrollado actualmente por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (US 5.558.864; Murphy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80), TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Biología Molecular, Cuba (US 5.891.996; US 6.506.883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81:mAb-806 (Ludwing Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Junbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138). En otra realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath®, Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una variedad de anticuerpos o fusiones de Fc que son sustancialmente similares a otros productos y candidatos clínicos, que incluyen, pero no se limitan a, muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión Fc anti-LFA-3 desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por MedImmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Abbot, Humicade™, un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Celltech, etanercept (Enbrel®), una fusión Fc de anti-TNF alfa desarrollado por Immunex/Amgen, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está siendo desarrollado por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therox (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que está siendo desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), que está siendo desarrollado por Antisoma, HuBC-1, que está siendo desarrollado por Antisoma, Thioplatin (AS1407) que está siendo desarrollado por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que está siendo desarrollado por Biogen, VLA-1 mAb, un anticuerpo anti-VLA-1 integrina que está siendo desarrollado por Biogen, LTBR mAb, un anticuerpo anti-receptor de linfotoxina beta (LTBR) que está siendo desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, J695, un anticuerpo anti-IL-12 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B™ un anticuerpo anti-Blys que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin™ (bevacizumab, rhuMAb-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que está siendo desarrollado por Genentech, un anticuerpo anti-familia de receptores HER que está siendo desarrollado por Genentech, Anti-Factor Tisular (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular que está siendo desarrollado por Genentech, Xolair™ (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que está siendo desarrollado por Genentech, Raptiva™ (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que está siendo desarrollado por Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (antiguamente LDP-02), que está siendo desarrollado por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que está siendo desarrollado por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anticuerpo anti-CD23 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) que están siendo desarrollados por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico que está siendo desarrollado por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que está siendo desarrollado por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-KDR que está siendo desarrollado por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que está siendo desarrollado por Imclone, anticuerpos anti-VE cadherina que están siendo desarrollados por Imclone, CEA-Cide™ (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) que está siendo desarrollado por Immunomedics, LymphoCide™ (Epratuzumab),

un anticuerpo anti-CD22 que está siendo desarrollado por Immunomedics, AFP-Cide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, LkoCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-070 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-018 que está siendo desarrollado por Medarex, Osidem™ (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 que está siendo desarrollado por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNF α que está siendo desarrollado por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citoquina que está siendo desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1)(CD54) que están siendo desarrollados por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) que está siendo desarrollado por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF™, un anticuerpo anti-interferón gamma que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, Anti-Integrina $\alpha 5\beta 1$, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, anti-IL-12, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM que está siendo desarrollado por Xoma, y MLN01, un anticuerpo anti-Integrina Beta2 que está siendo desarrollado por Xoma.

Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden incorporarse en los candidatos y productos clínicos mencionados anteriormente, o en anticuerpos y fusiones Fc que son sustancialmente iguales a ellos. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden incorporarse en versiones de los candidatos y productos clínicos mencionados anteriormente que son humanizados, madurados por afinidad, preparados por ingeniería, o modificados de alguna otra manera.

En una realización los polipéptidos Fc de la presente invención se usan para el tratamiento de indicaciones autoinmunes, inflamatorias, o de trasplante. Los antígenos diana y productos y candidatos clínicos que son relevantes para dichas enfermedades incluyen pero no están limitados a anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ tales como LDP-02, anticuerpos anti-integrina beta2, tales como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) tales como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 tales como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3, SMART anti-CD3, anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD14 tales como IC14, anticuerpos anti-CD18, anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 tales como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 tales como IDEC-114, anticuerpos anti-CD147 tales como ABX-CBL, anticuerpos anti-Eselectina tales como CDP850, anticuerpos anti-gp11b/IIIa tales como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 tales como ICM3, anticuerpos anti-ICE tales como VX-740, anticuerpos anti-FcR1 tales como MDX-33, anticuerpos anti-IgE tales como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 tales como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 tales como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 tales como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma, anticuerpos anti-TNF (TNF, TNF α , TNF β , TNF-alfa) tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren.

Las variantes de Fc de la presente invención tales como aquellas con unión incrementada a FcRn pueden utilizarse en moléculas inhibitoras de TNF para proporcionar propiedades aumentadas. Las moléculas inhibitoras de TNF útiles incluyen cualquier molécula que inhiba la acción de TNF-alfa en un mamífero. Los ejemplos adecuados incluyen la fusión Fc Enbrel® (etanercept) y los anticuerpos Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab). Los anticuerpos monoclonales (tales como Remicade y Humira) preparados por ingeniería usando las variantes de Fc de la presente invención para incrementar la unión a FcRn, pueden traducirse en mejor eficacia a través de una vida media incrementada.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos frente a enfermedades infecciosas. Los anticuerpos frente a células eucariotas incluyen anticuerpos dirigidos a células de levadura, incluyendo pero no limitado a *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *plasmodium falciparium*, y *Yarrowia lipolytica*.

Los anticuerpos frente a células fúngicas adicionales también son útiles, incluyendo antígenos diana asociados con cepas de *Candida* incluyendo *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *C. maltosa*, así como especies de *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, y *Penicillium*, entre otros.

Los anticuerpos dirigidos frente a antígenos diana asociados con protozoos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos asociados con *Trypanosoma*, especies de *Leishmania* incluyendo *Leishmania donovani*; *Plasmodium* spp., *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, y *Cyclospora cayetanensis*.

Los anticuerpos producidos frente a antígenos procariontas también son útiles, incluyendo anticuerpos frente a bacterias adecuadas tales como procariontas patógenos y no patógenos que incluyen pero no se limitan a *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis*; *Vibrio*, por ejemplo, *V. cholerae*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* Enterotoxigénica, *Shigella*, por ejemplo, *S. dysenteriae*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhi*; *Mycobacterium* por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Clostridium*, por ejemplo, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. perfringens*; *Corynebacterium*, por ejemplo,

C. diphtheriae; Streptococcus, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; Staphylococcus, por ejemplo, *S. aureus*; Haemophilus, por ejemplo, *H. influenzae*; Neisseria, por ejemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; Yersinia, por ejemplo, *Y. lambia*, *Y. pestis*, Pseudomonas, por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. putida*; Chlamydia, por ejemplo, *C. trachomatis*; Bordetella, por ejemplo, *B. pertussis*; Treponema, por ejemplo, *T. palladium*; *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Brucella* spp., *F. tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *C. botulinum*, *Salmonella* spp., toxina B SEB *V. Cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Trichosporon beigeli*, *Rhodotorula* especies, *Hansenula anomala*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria* sp., *Mycoplasma* sp. y similares.

En algunos aspectos, los anticuerpos están dirigidos frente a infecciones virales; estos virus incluyen, pero no se limitan a, incluyendo ortomixovirus, (por ejemplo, virus de influenza), paramixovirus (por ejemplo, virus sincitial respiratorio, virus de paperas, virus de sarampión), adenovirus, rinovirus, coronavirus, reovirus, togavirus (por ejemplo, virus de rubeola), parvovirus, poxvirus (por ejemplo, virus de viruela, virus vaccinia), enterovirus (por ejemplo, poliovirus, coxsackievirus), virus de hepatitis (incluyendo A, B y C), herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), rotavirus, virus Norwalk, hantavirus, arenavirus, rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia), retrovirus (incluyendo HIV, HTLV-I y -II), papovavirus (por ejemplo, papilomavirus), poliomavirus, y picornavirus, y similares.

Propiedades de Variantes de IgG Optimizadas

La presente solicitud también proporciona variantes de IgG que se optimizan para una variedad de propiedades terapéuticamente relevantes. Una variante de IgG que se prepara por ingeniería o se predice que presenta una o más propiedades optimizadas se refiere en la presente memoria como una "variante de IgG optimizada". Las propiedades más preferidas que pueden optimizarse incluyen pero no se limitan a una afinidad aumentada o reducida para FcRn y una vida media *in vivo* incrementada o disminuida. Realizaciones adecuadas incluyen anticuerpos que presentan afinidad de unión incrementada para FcRn a pH disminuido, tal como el pH asociado con endosomas, por ejemplo pH 6,0, mientras se mantiene la afinidad reducida a pH mayor, tal como 7,4., para permitir una captación incrementada en endosomas pero velocidades de liberación normales. De manera similar, estos anticuerpos con unión a FcRn modulada pueden tener opcionalmente otras propiedades deseables, tales como unión a FcγR modulada, tal como se resalta en U.S.S.N.s U.S.S.N.s 11/174.287, 11/124.640, 10/822.231, 10/672.280, 10/379.392, y la solicitud de patente titulada IgG Immunoglobulin variants with optimized effector function presentada el 21 de octubre, 2005 que tiene el n°. de solicitud 11/256.060. Esto es, las propiedades optimizadas también incluyen pero no se limitan a afinidad aumentada o reducida para un FcγR. En una realización opcional, las variantes de IgG se optimizan para poseer afinidad aumentada para un FcγR activador humano, preferiblemente FcγRIIIa además del perfil de unión a FcRn. En otra realización alternativa opcional más, las variantes de IgG se optimizan para poseer una afinidad reducida para el receptor inhibitor humano FcγRIIb. Esto es, realizaciones particulares abarcan el uso de anticuerpos que muestran una unión incrementada a FcRn, y unión incrementada a FcγRIIIa. Otras realizaciones utilizan el uso de anticuerpos que muestran unión incrementada para FcRn, y unión incrementada a FcγRIIIa. Estas realizaciones se anticipan para proporcionar polipéptidos IgG con propiedades terapéuticas aumentadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora aumentada y mayor potencia anti-cancerosa. En una realización alternativa, las variantes de IgG se optimizan para tener una afinidad incrementada o reducida para FcRn y afinidad incrementada o disminuida para un FcγR humano, que incluyen pero no se limita a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIIb incluyendo sus variaciones alélicas. Estas realizaciones se anticipan para proporcionar polipéptidos IgG con propiedades terapéuticas aumentadas en seres humanos, por ejemplo, vida media sérica incrementada y función efectora reducida. En otras realizaciones, las variantes de IgG proporcionan afinidad aumentada para FcRn y afinidad aumentada para uno o más FcγR, con afinidad reducida para uno o más FcγRs adicionales. Por ejemplo, una variante de IgG puede tener unión aumentada para FcRn y FcγRIIIa, con unión reducida para FcγRIIb. Alternativamente, una variante de IgG puede tener unión reducida para FcRn y para FcγR. En otra realización, una variante de IgG puede tener afinidad reducida para FcRn y afinidad aumentada para FcγRIIb, con afinidad reducida para uno o más FcγRs activadores. En otra realización más, una variante de IgG puede tener una vida media sérica incrementada y funciones efectoras reducidas.

Realizaciones preferidas comprenden la optimización de la unión a un FcRn y FcγR humano, sin embargo, en realizaciones alternativas las variantes de IgG poseen afinidad aumentada o reducida para FcRn y FcγR de organismos no humanos, que incluyen pero no se limitan a roedores y primates no humanos. Las variantes de IgG que se optimizan para unión a un FcRn no humano pueden encontrar uso en experimentación. Por ejemplo, los modelos de ratón están disponibles para una variedad de enfermedades que permiten el ensayo de propiedades tales como eficacia, toxicidad, y farmacocinética para un candidato a fármaco dado. Como se conoce en la técnica, las células cancerosas pueden injertarse o inyectarse en ratones para mimetizar un cáncer humano, un proceso referido como xenoinjerto. El ensayo de las variantes de IgG que comprenden variantes de IgG que se optimizan para FcRn puede proporcionar información valiosa respecto a las características de aclaramiento de la proteína, su mecanismo de aclaramiento, y similares. Las variantes de IgG también pueden optimizarse para funcionalidad incrementada y/o propiedades de disolución en forma aglicosilada. Los ligandos Fc incluyen pero no se limitan a FcRn, FcγRs, C1q, y proteínas A y G, y pueden ser de cualquier fuente que incluye pero no se limita a ser humano, ratón, rata, conejo, o mono, preferiblemente ser humano. En una realización preferida alternativa, las variantes de IgG se optimizan para ser más estables y/o más solubles que la forma aglicosilada de la variante de IgG parental.

Las variantes de IgG pueden incluir modificaciones que modulan la interacción con ligandos Fc distintos de FcRn y FcγRs, que incluyen pero no se limita a proteínas de complemento, y homólogos del receptor de Fc (FcRH). Los FcRHs incluyen pero no se limitan a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, y FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

- 5 Preferiblemente, la especificidad de ligando Fc de la variante de IgG determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante de IgG dada para propósitos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno diana y la enfermedad o indicación que se va a tratar. Para la mayor parte de las dianas e indicaciones, puede ser preferible una unión aumentada a FcRn ya que la unión aumentada a FcRn puede dar como resultado un incremento de la vida media sérica. Las vidas medias séricas mayores permiten una dosificación menos frecuente o dosificación menor del terapéutico. Esto es particularmente preferible cuando el agente terapéutico se proporciona en respuesta a una indicación que requiere administración repetida. Para algunas dianas e indicaciones, puede ser preferible una afinidad disminuida para FcRn. Esto puede ser particularmente preferible cuando se desea una variante de Fc con aclaramiento incrementado o vida media sérica disminuida, por ejemplo, en polipéptidos Fc usados como agentes formadores de imágenes o radio-terapéuticos.
- 10 Pueden usarse variantes de IgG que comprenden variantes de IgG que proporcionan afinidad aumentada para FcRn con afinidad aumentada para FcγR activadores y/o reducida para FcγR inhibidores. Para algunas dianas e indicaciones, puede ser además beneficioso utilizar variantes de IgG que proporcionen selectividad diferencial para diferentes FcγR activadores; por ejemplo, en algunos casos puede desearse una unión aumentada a FcγRIIa y FcγRIIIa, pro no FcγRI, mientras en otros casos, puede preferirse unión aumentada sólo a FcγRIIIa. Para determinadas dianas e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que alteran la unión a FcRn y aumentan las funciones efectoras tanto mediadas por FcγR como mediadas por complemento, mientras para otros casos puede ser ventajoso utilizar variantes de IgG que aumentan la unión a FcRn, o vida media sérica, y bien las funciones efectoras mediadas por FcγR o mediadas por complemento. Para algunas dianas o indicaciones de cáncer, puede ser ventajoso reducir o suprimir una o más funciones efectoras, por ejemplo, desactivando la unión a C1q, uno o más FcγR, FcRn, o uno o más ligandos de Fc. Para otras dianas e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que proporcionan unión aumentada al FcγRIIb inhibidor, con nivel WT, reducido, o unión suprimida a FcγRs activadores. Esto puede ser particularmente útil, por ejemplo, cuando el objetivo de una variante de IgG es inhibir la inflamación o enfermedad autoinmune, o modular el sistema inmune de alguna manera. Como las enfermedades autoinmunes son generalmente duraderas y el tratamiento se proporciona en dosificación repetida, se prefiere particularmente su tratamiento con variantes de Fc con vida media incrementada de FcRn incrementado.

La modificación puede hacerse para mejorar la estabilidad, solubilidad, función, o uso clínico de la IgG. En una realización preferida, las variantes de IgG pueden incluir modificaciones para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos. En una realización lo más preferida, la inmunogenicidad de una variante de IgG se reduce usando un método descrito en USSN 11/004.590. En realizaciones alternativas, las variantes de IgG se humanizan (Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402).

Las variantes de IgG pueden incluir modificaciones que reducen la inmunogenicidad. Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia parental a proteínas MHC. Por ejemplo, podrían prepararse por ingeniería modificaciones de aminoácidos, de manera que no hay o hay un número mínimo de epítopos inmunes que se predice que se unen, con alta afinidad, a cualquiera de los alelos MHC prevalentes. En la técnica se conocen varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en secuencias de proteínas y pueden usarse para puntuar epítopos en una variante de IgG. Véase, por ejemplo, WO 98/52976; WO 02/079232; WO 00/3317; USSN 09/903.378; USSN 10/039.170; USSN 60/222.697; USSN 10/754.296; PCT WO 01/21823; y PCT WO 02/00165; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561; WO 98/59244; WO 021069232; WO 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927-5933; y Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353-2358. La información basada en secuencia puede usarse para determinar una puntuación de unión para una interacción péptido - MHC dada (véase, por ejemplo, Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942-948; Sturniolo et. al., 1999, Nature Biotech. 17:555-561).

50 Variantes de IgG Preparadas por Ingeniería

Las variantes de la presente invención pueden diseñarse por varios medios. Las variantes, como se describe en la presente memoria, pueden ser inserciones, deleciones, sustituciones, otras modificaciones, o combinaciones de éstas y otros cambios. Una realización particularmente nueva de la presente invención es el diseño de inserciones y deleciones que bien mejoran o reducen la unión de un polipéptido Fc a un ligando Fc. Como se describe en la presente memoria, pueden hacerse inserciones o deleciones que incrementan o disminuyen la afinidad del polipéptido Fc para FcRn. Las inserciones y deleciones pueden diseñarse por estrategias racionales o por estrategias que incluyen el uso de componentes aleatorios, tales como creación o cribado de bibliotecas aleatoria o semi-aleatoria. En una realización alternativa, se describen sustituciones que incrementan o disminuyen la afinidad del polipéptido Fc para FcRn.

60

Modificaciones del Núcleo: Inserciones y deleciones

Los polipéptidos Fc variantes pueden crearse sustituyendo un aminoácido variante en lugar del aminoácido parental en una posición en el polipéptido Fc. Mediante la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos variantes en el polipéptido Fc, se alteran las cadenas laterales en esas posiciones. Las sustituciones más útiles modifican las propiedades de Fc alterando las cadenas laterales de Fc. Las cadenas laterales sustituidas pueden interaccionar directa o indirectamente con una pareja de unión de Fc que está asociada con una función o propiedad de Fc. Al menos una sustitución altera la estructura covalente de una o más cadenas laterales del polipéptido Fc parental.

Alternativamente, pueden crearse polipéptidos Fc variantes que cambian la estructura covalente del núcleo del polipéptido Fc parental. Los átomos del núcleo en proteínas son el nitrógeno peptídico, el carbono alfa, el carbonilo o el carbono peptídico y el oxígeno carbonilo. El cambio de la estructura covalente del núcleo proporciona métodos adicionales de alterar las propiedades de los polipéptidos Fc. La estructura covalente del núcleo de Fc puede alterarse por la adición de átomos en el núcleo, por ejemplo, insertando uno o más aminoácidos, o por la sustracción de átomos del núcleo, por ejemplo, delecionando uno o más aminoácidos. La estructura covalente del núcleo también puede alterarse cambiando átomos individuales del núcleo por otros átomos (Deechongkit et al., *J Am Chem Soc.* 2004.-126(51):16762-71). Como se conoce en la técnica y se ilustra en la presente memoria, pueden hacerse inserciones o deleciones de aminoácidos en polipéptidos Fc insertando o delecionando los nucleótidos correspondientes en el ADN que codifica el polipéptido Fc. Alternativamente, como se conoce en la técnica, pueden hacerse inserciones o deleciones de aminoácidos durante la síntesis de los polipéptidos Fc.

El diseño de inserciones o deleciones de aminoácidos que alteran la interacción del polipéptido Fc con una o más parejas de unión (por ejemplo, Fc γ R, FcRn, C1q) puede hacerse considerando la estructura del complejo del polipéptido Fc y su pareja de unión. En una realización menos preferida, el diseño puede hacerse considerando la estructura del polipéptido Fc y la información acerca de la región Fc implicada en la unión a la pareja de unión. Esta información puede obtenerse por experimentos de mutagénesis, experimentos de exposición en fago, comparaciones de homología, modelado informático u otros medios.

Las posiciones preferidas en la secuencia de aminoácidos para inserciones o deleciones que afectan las interacciones de unión de Fc, pero no afectan la estructura global, estabilidad, expresión o uso del polipéptido Fc, son en bucles que están implicados en las interacciones Fc/pareja de unión de Fc. Para alterar la unión de FcRn al polipéptido Fc, las posiciones 244-257, 279-284, 307-317, 383-390, y 428-435 son localizaciones preferidas de bucle para inserciones o deleciones (numeración del índice EU de Kabat et al., Burmeister et al., 1994, *Nature*, 372:379-383; Martin et al., 2001, *Mol Cell* 7:867-877). Para alterar la unión del receptor Fc γ al polipéptido Fc, las posiciones 229-239, 266-273, 294-299, y 324-331 son localizaciones preferidas de bucle para inserciones o deleciones (numeración del índice EU de Kabat et al., PDB código 1 E4K.pdb Sondermann et al. *Nature*. 2000 406:267). Los bucles son regiones del polipéptido no implicadas en la estructura de hélice alfa o lámina beta. Las posiciones de bucle son posiciones que no están ni en estructura hélice alfa ni lámina beta (van Holde, Johnson y Ho. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Nueva Jersey 1998, Capítulo 1 p2-67). Las posiciones de bucle se prefieren porque los átomos del núcleo son normalmente más flexibles y están probablemente menos implicadas en enlaces de hidrógeno comparado con los átomos de núcleo de hélices alfa y láminas beta. Por lo tanto, el alargamiento o acortamiento de un bucle debido a una inserción o deleción de uno o más aminoácidos es menos probable que de lugar a cambios grandes, disruptivos en el polipéptido Fc, incluyendo estabilidad, expresión u otros problemas.

Pueden usarse inserciones y deleciones para alterar la longitud del polipéptido. Por ejemplo, en las regiones de bucle, la alteración de la longitud del bucle da como resultado una flexibilidad y entropía conformacional alteradas del bucle. Las inserciones en el bucle incrementarán generalmente la entropía conformacional del bucle, que puede definirse como la constante de Boltzman multiplicada por el logaritmo natural del número de posibles conformaciones (van Holde, Johnson y Ho. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Nueva Jersey 1998, pp78). Mediante la inserción de al menos un aminoácido en un polipéptido, se incrementa el número total de conformaciones disponibles en el polipéptido. Estas conformaciones adicionales pueden ser beneficiosas para formar interacciones Fc/pareja de unión de Fc favorables porque el polipéptido Fc puede usar una de las conformaciones adicionales en la unión a la proteína de unión a Fc. En este caso, la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes. Si las conformaciones adicionales no se usan en la interfase de unión, la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles, porque las conformaciones adicionales competirían con la conformación competente para la unión. De manera similar, la deleción de un segmento de polipéptido también puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes o más débiles. Si la deleción de un segmento, que reduce el número posible de conformaciones de núcleo, elimina la conformación competente para la unión, la deleción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles. Si la deleción no elimina la conformación competente para la unión, la deleción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes porque la deleción puede eliminar conformaciones que compiten con la conformación competente para la unión.

Pueden usarse inserciones y deleciones para alterar las posiciones y orientaciones de los aminoácidos en el polipéptido Fc. Como las inserciones y deleciones causan un cambio en la estructura covalente del núcleo, causan necesariamente un cambio en las posiciones de los átomos del núcleo. La Figura 7 compara las posiciones en el

núcleo en algunos segmentos de bucle, marcadas L1 a L4, en tres núcleos diferentes. La estructura de núcleo de referencia contiene cuatro segmentos de bucle, mientras el núcleo de delección carece del segmento L1 y el segmento de inserción comprende un segmento adicional antes, es decir, N-terminal respecto a, el segmento L1. Las delecciones e inserciones causan el mayor cambio en la estructura del núcleo cerca del sitio de la inserción o delección. Mediante la delección de un segmento cerca del extremo N-terminal del bucle, por ejemplo, segmento L1, el bucle se acorta y los segmentos remanentes cambian su posición más cerca del extremo N del bucle. Esto tiene el efecto de mover el segmento L2 hacia la localización anterior del segmento L1 y hacia el extremo N del bucle. Este cambio de posición del segmento L2 hacia el segmento L1 puede reforzar la unión del complejo Fc/pareja de unión de Fc y se prefiere cuando hay una información anterior que sugiere que el aminoácido o aminoácidos localizados en L2 establecen interacciones favorables con la pareja de unión de Fc, cuando están localizados en L1. Por ejemplo, si L2 contiene alanina y tirosina y la sustitución de dos aminoácidos en L1 para alanina y tirosina da lugar previamente a una variante de Fc con unión incrementada, la delección de L1 puede crear una variante de Fc con afinidad incrementada para la pareja de unión de Fc.

De manera similar, una inserción de un segmento de polipéptido en un polipéptido Fc en el lado N-terminal de un bucle causa que las posiciones de los segmentos del bucle cambien hacia el lado C-terminal del bucle. En la Figura 7, una inserción de uno o más aminoácidos antes, es decir, N-terminal respecto a, el segmento L1 altera la conformación del bucle incluyendo un desplazamiento del segmento L1 hacia el extremo C-terminal del bucle. Este tipo de inserción se prefiere cuando se sabe que los aminoácidos localizados en el segmento L1 establecen interacciones favorables cuando están localizados en las posiciones L2, ya que la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes. Si se desean interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles, la inserción puede usarse para cambiar aminoácidos no favorables a una nueva posición. Los segmentos insertados, delecionados y de referencia (L1 a L4 en la Figura 7) pueden ser uno o más de un aminoácido en el polipéptido Fc.

Alternativamente, pueden usarse inserciones o delecciones en el extremo C-terminal de bucles de una manera análoga a las inserciones o delecciones en el extremo N-terminal de bucles. Las inserciones en el extremo C del bucle pueden dar lugar a un movimiento de las posiciones N-terminales de la inserción hacia el extremo N del bucle. Las delecciones en el extremo C del bucle pueden dar lugar a un movimiento de las posiciones N-terminales de la delección hacia el extremo C del bucle. La elección de usar una inserción o delección en el extremo N-terminal o C-terminal del bucle se basa en los aminoácidos localizados en el bucle, el deseo de afinidad incrementada o disminuida de Fc/pareja de unión de Fc, y el cambio posicional deseado.

Pueden usarse inserciones o delecciones en cualquier región de un polipéptido Fc, incluyendo los bucles, las regiones de hélice alfa, y lámina beta. Las localizaciones preferidas para inserciones y delecciones incluyen las regiones de bucle, que son aquellas que no son regiones en hélice alfa o lámina beta. Se prefieren los bucles porque aceptan generalmente alteraciones en el núcleo mejor que las hélices alfa o láminas beta. Las localizaciones particularmente preferidas para inserciones o delecciones que dan como resultado interacciones proteína/proteína más fuertes son en los extremos N-terminal o C-terminal de un bucle. Si las cadenas laterales del bucle están implicadas en las interacciones Fc/pareja de unión de Fc, las inserciones o delección en los extremos probablemente dan lugar a menos cambios muy perjudiciales en las interacciones de unión. Las delecciones en el centro exacto del bucle eliminan más probablemente restos importantes en la interfase Fc/pareja de unión de Fc y las inserciones en el centro exacto del bucle crean más probablemente interacciones desfavorables en la interfase Fc/pareja de unión de Fc. El número de restos delecionado o insertado puede determinarse por el tamaño del cambio en el núcleo deseado prefiriéndose inserciones o delecciones de 15 o menos restos, prefiriéndose más las inserciones o delecciones de 10 o menos restos, y siendo lo más preferido inserciones o delecciones de 5 o menos restos.

Una vez se diseña la posición y el tamaño de una variante de delección de Fc, la secuencia completa de polipéptido se determina completamente y el polipéptido puede construirse por métodos conocidos en la técnica.

Las variantes de inserción de Fc, sin embargo, tienen la etapa adicional de diseñar la secuencia de al menos un aminoácido que se va a insertar. Las inserciones de restos polares, incluyendo Ser, Thr, Asn, Gln, Ala, Gly, His, se prefieren en posiciones que se espera que van a estar expuestas en el polipéptido Fc. Los aminoácidos más pequeños, incluyendo Ser, Thr, y Ala, se prefieren particularmente ya que el tamaño pequeño interferirá estéricamente menos probablemente con las interacciones Fc/pareja de unión de Fc. Ser y Thr también tienen la capacidad de enlace de hidrógeno con átomos en la pareja de unión de Fc.

Las inserciones también tienen la flexibilidad añadida de que el polipéptido insertado puede diseñarse para establecer interacciones favorables con la pareja de unión de Fc como se desearía cuando se desea una unión Fc/pareja de unión de Fc más fuerte. La longitud de la inserción del núcleo puede determinarse modelando el núcleo variante con una secuencia genérica simple que se va a insertar. Por ejemplo, pueden construirse y modelarse inserciones de poliserina, poliglicina o polialanina de diferentes longitudes. El modelado puede hacerse por una variedad de métodos, incluyendo modelado de homología basado en estructuras tridimensionales conocidas de homólogos que comprenden la inserción, y por modelado informático incluyendo MODELLER (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) y ROSETTA (Kuhlman et al. (2003). Science 302, 1364-8). Normalmente, se generan inicialmente varias conformaciones de núcleo y la estructura final de núcleo puede determinarse después de establecer las identidades de la cadena lateral. Las cadenas laterales pueden diseñarse

por algoritmos PDA® (US 6.188.965; 6.269.312; 6.403.312; 6.801.861; 6.804.611; 6.792.356; 6.950.754; y USSN 09/782.004; 09/927.790; 10/101.499; 10/666.307; 10/666311; 10/218.102).

Las inserciones y deleciones pueden hacerse para alterar la unión de polipéptidos Fc a Fc γ R de una manera análoga al método descrito para alterar las propiedades de unión de FcRn. Los dominios Fc se unen a Fc γ 1R en la posición indicada en la Figura 1. Las estructuras del complejo Fc/Fc γ 1R, incluyendo PDB códigos 1T89 y 1IIS (Radaev S et al. J. Biol. Chem. v276, p.16469-16477), demuestran los restos que interaccionan y los bucles entre las dos estructuras. Los resultados de mutagénesis tales como los encontrados en US11/124620 y US6737056 tienen toda utilidad para determinar los cambios apropiados del posicionamiento del núcleo.

Pueden diseñarse inserciones y deleciones en cualquier polipéptido además de los polipéptidos Fc por los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, pueden diseñarse inserciones o deleciones en el miembro de la superfamilia TNF, APRIL, con la ayuda de su estructura tri-dimensional (PDB código 1XU1.pdb, Hymowitz, et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:7218). Pueden diseñarse inserciones o deleciones para incrementar la unión de APRIL a su receptor, TACI. Los restos de bucle preferidos como sitios de inserción o deleción son los restos Ser118-Val124, Asp164-Phe167, Pro192-Ala198, Pro221-Lys226. Estos bucles interaccionan con TACI en el complejo APRIL/TACI y median la unión.

Polipéptidos que incorporan variantes

Las variantes de IgG pueden basarse en secuencias de IgG humana, y así se usan secuencias de IgG humana como las secuencias "base" frente a las que se comparan otras secuencias, que incluyen pero no se limitan a secuencias de otros organismos, por ejemplo, secuencias de roedor y primate. Las variantes de IgG también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgE, IgD, IgM, y similares. Se contempla que, aunque las variantes de IgG se preparan por ingeniería en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden prepararse por ingeniería en o "transferirse" en el contexto de otra, segunda IgG parental. Esto se hace determinando los restos "equivalentes" o "correspondientes" y sustituciones entre la primera y segunda IgG, normalmente basado en homología de secuencia o estructural entre las secuencias de las IgGs. Con el fin de establecer homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG mostrada en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineamiento para homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando restos conservados como entre especies), permitiendo inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados mediante deleción e inserción arbitraria), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de IgG. El alineamiento de restos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de dichos restos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75% o tan poco como 50% de los restos conservados también es adecuado para definir restos equivalentes. Los restos equivalentes también pueden definirse determinando la homología estructural entre una primera y una segunda IgG esto es al nivel de estructura terciaria para IgG cuyas estructuras se han determinado. En este caso, los restos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto de aminoácidos particular del parental o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se consigue después de que se haya orientado y posicionado el mejor modelo para proporcionar la superposición máxima de coordenadas atómicas de átomos de proteína distintos de hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los restos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG parental en la que se hacen las IgG, lo que se quiere transmitir es que las variantes de IgG descubiertas puedan prepararse por ingeniería en una segunda IgG parental que tiene una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de IgG. Por tanto, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en el que el anticuerpo parental es una IgG1 humana, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar restos equivalentes, el anticuerpo variante puede prepararse por ingeniería en otro anticuerpo IgG1 parental que se une a un antígeno diferente, un anticuerpo IgG2 parental humano, un anticuerpo IgA parental humano, un anticuerpo IgG2a o IgG2b parental de ratón, y similares. De nuevo, como se ha descrito anteriormente, el contexto de la variante de IgG parental no afecta la capacidad de transferir las variantes de IgG a otras IgG parentales.

Se proporcionan métodos para preparar por ingeniería, producir, y cribar variantes de IgG. No se pretende que los métodos descritos se restrinjan a ninguna aplicación o teoría particular de operación. En lugar de esto, se pretende que los métodos proporcionados ilustren generalmente que una o más variantes de IgG pueden prepararse por ingeniería, producirse, y cribarse experimentalmente para obtener variantes de IgG con función efectora optimizada. Se describen una variedad de métodos para diseñar, producir, y ensayar variantes de anticuerpo y proteína en USSN 10/754.296, y USSN 10/672.280.

Puede usarse una variedad de métodos de preparación por ingeniería de proteínas para diseñar variantes de IgG con función efectora optimizada. En una realización, puede usarse un método de preparación por ingeniería basado en estructura, en el que la información estructural disponible se usa para guiar las sustituciones, inserciones o deleciones. En una realización preferida, puede usarse un método de cribado computacional, en el que las sustituciones se diseñan tomando como base su aptitud energética en cálculos computacionales. Véase, por ejemplo USSN 10/754.296 y USSN 10/672.280, y las referencias citadas en ellas.

Un alineamiento de secuencias puede usarse para guiar las sustituciones en las posiciones identificadas. Un experto en la técnica apreciará que el uso de información de secuencia puede frenar la introducción de sustituciones que son potencialmente perjudiciales para la estructura de la proteína. La fuente de las secuencias puede variar ampliamente, e incluye una o más de las bases de datos conocidas, que incluyen pero no se limitan a la base de datos Kabat (Northwestern University); Johnson y Wu, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29:205-206; Johnson y Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:214-218), la base de datos IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:209-212; Ruiz et al., 2000 *Nucleic Acids Res.* 28:219-221; Lefranc et al., 2001, *Nucleic Acids Res.* 29:207-209; Lefranc et al., 2003, *Nucleic Acids Res.* 31:307-310), y VBASE. La información de la secuencia de anticuerpo puede obtenerse, recopilarse, y/o generarse a partir de alineamientos de secuencia de secuencias de línea germinal o secuencias de anticuerpos naturales de cualquier organismo, que incluyen pero no se limita a mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que el uso de secuencias que son humanas o sustancialmente humanas puede tener además la ventaja de ser menos inmunogénicas cuando se administran a un ser humano. Otras bases de datos que son bases de datos más generales de ácidos nucleicos o proteínas, es decir, no particulares para anticuerpos, incluyen pero no se limitan a SwissProt, GenBank Entrez, y EMBL Nucleotide Sequence Database. Las secuencias alineadas pueden incluir secuencias VH, VL, CH, y/o CL. Existen numerosos programas de alineamiento basados en secuencia y métodos conocidos en la técnica, y todos éstos encuentran uso en la generación de alineamientos de secuencia.

Alternativamente, pueden usarse métodos de mutagénesis aleatoria o semi-aleatoria para hacer modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas. En estos casos, las posiciones se eligen aleatoriamente, o los cambios de aminoácidos se hacen usando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los restos pueden mutarse a alanina, referido como escaneo de alanina. Dichos métodos pueden acoplarse con estrategias de ingeniería más sofisticadas que emplean métodos de selección para cribar niveles más altos de diversidad de secuencia. Como es muy conocido en la técnica, hay una variedad de tecnologías de selección que pueden usarse para dichas estrategias, incluyendo, por ejemplo, tecnologías de exposición tales como exposición en fago, exposición en ribosomas, exposición en la superficie celular, y similares, como se describe más adelante.

Los métodos para la producción y cribado de variantes de IgG son muy conocidos en la técnica. Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación, y cribado de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel y Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard y Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76. Véanse también los métodos descritos en USSN 10/754.296; USSN 10/672.280; y USSN 10/822.231; y 11/124.620. Las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 8. Alternativamente, las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 9. Además, alternativamente, las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 10. Estas variantes han mostrado una unión incrementada al receptor de Fc, FcRn, como se ilustra en los ejemplos.

Preparación de variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, las secuencias de variantes de IgG se usan para crear ácidos nucleicos que codifican las secuencias miembro, y pueden clonarse, expresarse y ensayarse en células huésped, si se desea. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos, y una variedad de métodos que pueden encontrar uso se describen en *Molecular Cloning -A Laboratory Manual*, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de IgG pueden incorporarse en un vector de expresión con el fin de expresar la proteína. Los vectores de expresión incluyen normalmente una proteína unida de manera operativa, esto es, posicionada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión, y/o elemento adicionales. Las variantes de IgG pueden producirse cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las variantes de IgG, bajo las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Puede usarse una amplia variedad de células huésped apropiadas, que incluyen pero no se limita a células de mamífero, bacterias, células de insecto, y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso se describen en el catálogo de líneas celulares de ATCC, disponible en la American Type Culture Collection. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células huésped son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula huésped usada.

En una realización preferida, las variantes de IgG se purifican o aíslan después de la expresión. Los anticuerpos pueden aislarse o purificarse de varias formas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos estándar de purificación incluyen técnicas cromatográficas, electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, diálisis, filtración, concentración, y técnicas de cromatofluorecencia. Como es bien conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a anticuerpos, por ejemplo, las proteínas bacterianas A, G, y L, y estas proteínas pueden encontrar uso en la purificación. Frecuentemente, la purificación puede permitirse por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, las proteínas pueden purificarse usando resina de glutatión si se emplea una fusión con GST, cromatografía de afinidad de Ni²⁺ si se emplea His marcada, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa un marcador flag. Para las directrices generales sobre técnicas de purificación adecuadas, véase *Antibody Purification: Principles and Practice*, 3ª Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994.

Cribado de Variantes de IgG

Las variantes de Fc pueden cribarse usando una variedad de métodos, que incluyen pero no se limitan a aquellos que usan ensayos *in vitro*, *in vivo* y ensayos basados en células, y tecnologías de selección. Pueden utilizarse tecnologías de cribado automatizadas y de alto rendimiento en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear el uso de una pareja de fusión o marcador, por ejemplo un marcador inmune, marcador isotópico, o marcador que es una molécula pequeña tal como un agente fluorescente o colorimétrico.

En una realización preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las variantes de Fc se criban en un ensayo *in vitro*. En una realización preferida, la proteína se criba para la funcionalidad, por ejemplo, su capacidad de catalizar una reacción o su afinidad de unión a su diana.

Como se conoce en la técnica, los subconjuntos de métodos de cribado son aquellos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se refieren en la presente memoria como "métodos de selección", y estos métodos encuentran uso en la presente invención para cribar variantes de Fc. Cuando se criban bibliotecas de proteínas usando un método de selección, sólo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, esto es que cumplen algunos criterios de selección, se propagan, aíslan, y/o observan. En la técnica se conoce una variedad de métodos de selección que pueden encontrar uso en la presente invención para el cribado de bibliotecas de proteínas. Otros métodos de selección que pueden encontrar uso en la presente invención incluyen métodos que no se basan en la exposición, tales como métodos *in vivo*. Un subconjunto de métodos de selección referidos como métodos de "evolución dirigida" son aquellos que incluyen el acoplamiento o reproducción de secuencias favorables durante la selección, algunas veces con la incorporación de nuevas mutaciones.

En una realización preferida, las variantes de Fc se criban usando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para dichos ensayos, las proteínas purificadas o no purificadas se añaden normalmente de forma exógena de manera que las células se exponen a variantes individuales o conjuntos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan normalmente, pero no siempre, en la función del polipéptido Fc; esto es, la capacidad del polipéptido Fc de unirse a su diana y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo, función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis, y similares. Dichos ensayos implican frecuentemente monitorizar la respuesta de células a la IgG, por ejemplo supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o un gen informador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de variantes de Fc para incitar ADCC, ADCP, o CDC. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, estos es además de las células diana, por ejemplo complemento sérico, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMCs), células NK, macrófagos, y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente seres humanos, ratones, rata, conejo, y mono. Los anticuerpos pueden causar apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar el ataque a células diana por células inmunes que se han añadido al ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte o viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de agentes de tinción, reactivos inmunológicos, citoquímicos, y radiactivos. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. Alternativamente, los cribados basados en células se llevan a cabo usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Esto es, las variantes de Fc no se añaden exógenamente a las células.

Las propiedades biológicas de las variantes de IgG pueden caracterizarse en experimentos en células, tejidos, y organismos completos. Como se conoce en la técnica, los fármacos se ensayan frecuentemente en animales, que incluyen pero no se limita a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia del fármaco para el tratamiento frente a una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad, y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden referirse como modelos de enfermedad. Los terapéuticos se ensayan frecuentemente en ratones, que incluyen pero no se limitado a ratones desnudos, ratones SCID, ratones con xenoinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo con activaciones e inactivaciones inmunogénicas). Dicha experimentación puede proporcionar datos con significado para la determinación del potencial de la proteína que se va a usar como un terapéutico. Para el ensayo puede usarse cualquier organismo, preferiblemente mamíferos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por tanto, pueden usarse para ensayar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, u otra propiedad de las IgG. Los ensayos en seres humanos se requieren finalmente para la aprobación como fármacos, y por tanto, por supuesto se contemplan estos experimentos. Por tanto, las IgG pueden ensayarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética, y/o otras propiedades clínicas.

Métodos para Usar las Variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden encontrar uso en un amplio rango de productos. En una realización, la variante de IgG es un reactivo terapéutico, de diagnóstico, o de investigación, preferiblemente un terapéutico. La variante de IgG puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, las variantes de IgG se usan para matar células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una realización alternativa, las variantes de IgG se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo, para antagonizar una citoquina o receptor de citoquina. En una realización alternativa

preferida, las variantes de IgG se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y matar las células diana que portan el antígeno diana.

Las variantes de IgG pueden usarse para varios propósitos terapéuticos. En una realización preferida, un anticuerpo que comprende la variante de IgG se administra a un paciente para tratar un trastorno relacionado con anticuerpos. Un "paciente" para los propósitos incluye seres humanos y otros animales, preferiblemente mamíferos y lo más preferiblemente seres humanos. Por "trastorno relacionado con anticuerpos" o "trastorno que responde a anticuerpos" o "afección" o "enfermedad" en la presente memoria significa un trastorno que puede mejorarse mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una variante de IgG. Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen pero no se limitan a enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. Por "cáncer" y "canceroso" en la presente memoria se hace referencia a o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. 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.

En una realización, una variante de IgG es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, la variante de IgG se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen pero no se limitan a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. Las variantes de IgG pueden administrarse simultáneamente con uno o más de otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante de IgG puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o tanto quimioterapia como terapia de radiación. En una realización, la variante de IgG puede administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos, que pueden o no ser una variante de IgG. De acuerdo con otra realización, la variante de IgG y una o más de otras terapias anti-cancerosas se emplean para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y, particularmente, el trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto, se contempla que las variantes de IgG pueden emplearse en combinación con aún otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.

Una variedad de otros agentes terapéuticos puede encontrar uso para administración con las variantes de IgG. En una realización, la IgG se administra con un agente anti-angiogénico. Por "agente anti-angiogénico" tal y como se emplea en la presente memoria significa un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado con, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, fusión Fc, o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en promover la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en la presente memoria es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF). En una realización alternativa, la IgG se administra con un agente terapéutico que induce o mejora la respuesta inmunológica, adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que tiene como diana CTLA-4. En una realización alternativa, la IgG se administra con un inhibidor de tirosina quinasa. Por "inhibidor de tirosina quinasa" tal y como se emplea en la presente memoria significa una molécula que inhibe en algún grado la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, las variantes administran con una citoquina.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan una variante de IgG y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de IgG se preparan para almacenamiento mezclando la IgG que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables farmacéuticamente opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980, incorporado en su totalidad por referencia), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Las formulaciones que se van a usar para administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las variantes de IgG y otros agentes activos terapéuticamente descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas, y/o incluidos en microcápsulas.

La concentración de la variante de IgG activa terapéuticamente en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100% en peso. En una realización preferida, la concentración de la IgG está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Con el fin de tratar a un paciente, puede administrarse una dosis eficaz terapéuticamente de la variante de IgG. Por "dosis eficaz terapéuticamente" en la presente memoria significa una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será discernible por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden oscilar de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo, 0,01, 0,1, 1,0, 10, ó 50 mg/kg de peso corporal, prefiriéndose 1 a 10mg/kg. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para degradación de proteína, administración sistémica frente a localizada, y velocidad de nueva síntesis de proteasa, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y será discernible con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante de IgG, preferiblemente en la forma de una disolución acuosa estéril, puede hacerse de varias maneras, que incluyendo, pero no se limitan a, oralmente,

subcutáneamente, intravenosamente, parenteralmente, intranasalmente, intraóticamente, intraocularmente, rectalmente, vaginalmente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente (por ejemplo, tecnología inhalable AERx® disponible comercialmente en Aradigm, o sistema de administración pulmonar Inhance® disponible comercialmente en Nektar Therapeutics, etc.). El terapéutico descrito en la presente memoria puede administrarse con otros terapéuticos simultáneamente, es decir, los terapéuticos descritos en la presente memoria pueden co-administrarse con otras terapias o terapéuticos, que incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, otros biológicos, terapia de radiación, cirugía, etc.

Ejemplos

10 A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. No se pretende que estos ejemplos que restrinjan la presente invención a ninguna aplicación o teoría particular de operación. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es según el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Los expertos en la técnica de anticuerpos apreciarán que esta convención consiste en
15 numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de inmunoglobulinas. Por consiguiente, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada según se definen por el índice EU no corresponderán necesariamente a su secuencia secuencial.

Ejemplo 1. Construcción de ADN, expresión, y purificación de variantes de Fc

20 Se realizaron por ingeniería modificaciones de aminoácidos en la región Fc de los anticuerpos IgG para mejorar la afinidad por el receptor Fc neonatal FcRn. Las variantes se cribaron en el contexto de varias cadenas constantes de IgG humano diferentes (Figura 2), que incluyen IgG1, IgG2, y unas secuencias de IgG híbridas que contienen el CH1 y la bisagra superior de IgG1 y la región Fc de IgG2. Los expertos en la técnica apreciarán las diferentes interacciones de la región IgG1 y IgG2 con los FcγRs y el complemento, estas regiones Fc diferentes a la parental
25 tendrán diferentes FcγR y diferentes propiedades de la función efectora mediada por el complemento. En la Figura 3 se muestran ejemplos de secuencias de variantes Fc en el contexto de estas cadenas constantes de IgG parental.

Las variantes de Fc se realizaron mediante ingeniería en el contexto de un anticuerpo que se dirige a un factor endotelial vascular (VEGF). Las regiones variables de la cadena pesada y ligera (VH y VL, de sus siglas en inglés) son de la versión humanizada de un anticuerpo A4.6.1, también referidas como bevacizumab (Avastin®), la cual está
30 aprobada para el tratamiento de una variedad de cánceres. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de este anticuerpo se muestran en la Figura 4.

Los genes que codifican la cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-VEGF se construyeron en el vector de expresión de mamíferos pTT5. Los genes de cadena constante de IgG1 y IgG2 humana se obtuvieron a partir de clones IMAGE y se subclonaron en el vector pTT5. El gen de IgG1/2 se construyó empleando la mutagénesis de
35 PCR. Los genes de VH y VL que codifican los anticuerpos VEGF se sintetizaron comercialmente (Blue Heron Biotechnologies, Bothell WA), se subclonaron en vectores que codifican el CL, IgG1, IgG2 y las cadenas constantes IgG1/2. Las modificaciones de aminoácidos se realizaron empleando mutagénesis dirigida a sitio usando el método Quikchange® (Stratagene, La Jolla CA). Se secuenció todo el ADN para confirmar la fidelidad de las secuencias.

Los plásmidos que contenían el gen de la cadena pesada (VH-C_γ1-C_γ2-C_γ3) se co-transfectaron con plásmido que contenía el gen de la cadena ligera (VL-C_κ) en células 293E empleando lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad CA) y se cultivaron en un medio FreeStyle 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se recogieron los medios 5 días después del cultivo, y los anticuerpos se purificaron del sobrenadante de cultivo usando la resina MabSelect de afinidad con proteína A (GE Healthcare). Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce).

45 Ejemplo 2. Anticuerpos de variantes Fc que mantienen la unión al antígeno

La fidelidad de las variantes de anticuerpos expresados se confirmó mediante la demostración de que mantienen especificidad por el antígeno. La unión a VEGF se controló empleando resonancia plasmónica de superficie (SPR, Biacore), llevada a cabo empleando un instrumento Biacore 3000. El VEGF recombinante (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ), se adherió a la superficie del chip CM5 mediante el acoplamiento con N-hidroxisuccinimida/N-etil-N'-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (NHS/EDC) empleando métodos estándar. Los anticuerpos WT y las variantes
50 se inyectaron como analitos, y en respuesta, se obtuvo la respuesta medida en unidades de resonancia (RU). La fase de disociación fue demasiado lenta como para medir las constantes de equilibrio reales, y se determinó la unión relativa midiendo las unidades de resonancia al final de la fase de asociación, que debería ser proporcional a la concentración de proteína (que se mantiene constante en el experimento) y la tasa constante de asociación. Los datos (Figura 6) muestran que los anticuepos anti-VEGT variantes mantienen la unión al antígeno, al contrario que el control negativo del anticuerpo anti-Her2 que no se une a VEGF.
55

Ejemplo 3. Medición de la unión al FcRn humano

Se midió la unión de las variantes de anticuerpos a pH 6,0, el pH al que se une de manera natural en los endosomas. Se construyeron los vectores que codifican microglobulina beta 2 y genes de cadena alfa marcada con His de FcRn, se co-transfectaron en células 293T, y se purificaron empleando cromatografía de níquel. Se midió la afinidad del anticuerpo para FcRn humano (hFcRn) a pH 6,0 en un instrumento Biacore 3000 mediante acoplamiento a FcRn humano a una superficie de un chip CM5 empleando química NHS/EDC estándar. Los anticuerpos WT y variantes se emplearon en la fase móvil a una concentración de 25-100 nM y la respuesta se midió en unidades de resonancia. Se obtuvieron las fases de asociación y disociación a pH 6,0, seguido por una inyección de un tampón de pH 7,4 para medir la liberación del anticuerpo a partir del receptor a un pH mayor. Un ciclo sólo con anticuerpo y un tampón proporcionó la respuesta de referencia, la cual se restó a cada sensograma de la muestra.

La Figura 7 muestra los sensogramas Biacore para la unión de IgG1 nativo y los anticuerpos variantes de Fc al FcRn humano a los dos pHs relevantes. Los datos muestran que los anticuerpos de tipo salvaje y las variantes se unen fácilmente al chip de FcRn a pH 6,0 y se disocian lentamente a este pH, como lo harían en el endosoma, con todo se liberan rápidamente a pH 7,4, como lo harían tras el reciclado del endosoma a la membrana y en la exposición a un pH mayor de suero.

Las curvas de asociación/diasociación a FcRn no se ajustaron a un modelo de Langmuir simple, debido posiblemente al anticuerpo y la multi-valencia del receptor o a la heterogeneidad del chip. Se determinaron los valores Pseudo-Ka (referido como Ka*) mediante el ajuste a un modelo de intercambio conformacional con el índice refractivo (RI) fijado a RU 0. Estos valores para los anticuerpos de variantes seleccionados se marcan en la Figura 8. Se calculó la afinidad relativa para cada variante comparado con su IgG parental según la ecuación n° de veces = $(Ka^* \text{ WT} / Ka^* \text{ de la variante})$. Los datos de unión relativos para todas las variantes de Fc en una región de Fc de IgG1 se representan en la Figura 9, y los datos de unión para las variantes en los anticuerpos con una región Fc de IgG2 (cadenas constantes de IgG1 y de IgG1/2) se representan en la Figura 10. Para muchas variantes, el experimento de unión se repitió en múltiples tiempos (n), cuyos n° de veces se calcularon en referencia a la IgG WT parental dentro de cada experimento particular. El promedio de estos datos proporcionó la media y la desviación estándar, como se representa en las Figuras 9 y 10.

Las Figuras 9 y 10 muestran que un número de variantes por ingeniería se unen con mayor afinidad la unión a FcRn humano a pH 6,0 en relación al IgG1 WT. Las mejoras eran estrechamente dependientes de la identidad de sustitución a una posición dada. Por ejemplo, empleando el doble como criterio para una unión mejorada, varias posiciones en posición 434 en la IgG2 incrementarían la afinidad (A, S, Y, F, y W), algunos eran neutrales (dentro del doble de IgG2 WT) (G, H, M, y T), y varias de las sustituciones redujeron la afinidad (<0,5 veces) (D, E, K, P, R, y V). Una mayor unión en el contexto de IgG1 no se traducían necesariamente en una mayor unión en la IgG2 (por ejemplo, 434T era mejor en la unión en la IgG1 pero no en la IgG2). Por otra parte, las mejoras proporcionadas por variantes en solitario no siempre adicionaban tras la combinación. La Figura 11a demuestra esto de manera gráfica mediante el trazado del n° de veces de la unión a FcRn experimental mediante la selección de variantes de sustitución doble frente al producto del n° de veces de la unión a FcRn por las variantes en solitario individuales que las componen. La línea recta representa la adición perfecta, es decir, el valor que se esperaría o predeciría a partir del producto de las sustituciones en solitario. Varias de estas variantes dobles disminuyen o mantienen esta línea (259I/319I, 259I/428L, 319I/428L, y 308F/428L). Varias variantes son menos aditivas (319I/308F, 252Y/428L, y 428L/434M). Para estas variantes, particularmente en el caso de las dos últimas (252Y/428L, y 428L/434M), las mejoras de afinidad de las sustituciones en solitario parecerían ser incompatibles con cada una cuando se combinaban. De manera sorprendente, las mejoras de afinidad a FcRn de las variantes 259I/308F y 428L/434S eran mayores de lo que se esperaba a partir de las afinidades de sus sustituciones en solitario respectivas. Estas sustituciones en solitario particulares tenían mejoras sinérgicas imprevistas cuando se combinaban. La diferencia entre afinidades experimentales y las predichas a partir de las afinidades de las variantes individuales se trazan en la Figura 11b, con las variantes agrupadas según sus variantes en solitario combinadas (259I, 308F, y 319I a la izquierda, y combinaciones con 428L a la derecha). La sinergia se puede cuantificar calculando el n° de veces del valor experimental en relación al valor predicho, seguido de la normalización hasta 1 y la conversión a un porcentaje (% de sinergia = $100 \times [(n^{\circ} \text{ veces experimentales} / n^{\circ} \text{ veces predichas}) - 1]$). Este análisis se dibuja en la Figura 11b, con las variantes agrupadas según su compuesto de variantes individuales. Esta gráfica destaca de nuevo la sinergia de algunas de las variantes, particularmente de 259I/308F y 428L/434S. Las Figuras 11b y 11c resaltan también la naturaleza no predictiva de combinar muchas de las mejores sustituciones individuales a partir del cribado. Por ejemplo, mientras que la combinación de 428L con 434S y 259I proporcionan mejoras de unión sinérgicas, 252Y o 434M tenían un impacto negativo cuando se combinaron con 428L. La drástica diferencia entre combinar 428L con 434S frente a 434M destaca además la importancia de la identidad del aminoácido particular en la sustitución en una posición dada.

Ejemplo 4. Ensayo de las variantes en otros contextos de anticuerpos

Se construyeron variantes seleccionadas en el contexto de anticuerpos que se dirigen a otros antígenos, incluyendo TNF (TNF α), CD25 (TAC), EGFR, y IgE. La Figura 4 proporciona las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos que se dirigen a estos antígenos que se emplearon en la invención. Los anticuerpos anti-TNF WT y variantes de Fc contienen la región variable del anticuerpo humano completo adalimumab (Humira®) aprobado actualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide (RA), artritis idiopática juvenil (JIA), artritis psoriásica (PsA), espondilitis anquilosante (AS), y la enfermedad de Crohn (CD). Los anticuerpos anti-CD25 WT y

variantes de Fc son versiones humanizadas del anticuerpo anti-TAC (Junghans et al., 1990, Cancer Research 50:1495-1502), referidos como anti-TAC H1.8/L1. Los anticuerpos anti-EGFR WT y variantes de Fc son versiones humanizadas del anticuerpo C225 murino, referido como C225 H4.42/L3.32. Finalmente, los anticuerpos WT y variantes de Fc anti-IgE contienen la región variable del anticuerpo humanizado omalizumab (Xolair®), que está aprobado para el tratamiento del asma alérgico.

Se construyeron los anticuerpos WT y las variantes, se expresaron, y purificaron como se describe anteriormente. Los anticuerpos se ensayaron para la unión de FcRn humano a pH 6,0 mediante Biacore como se describe anteriormente. Los datos de unión relativos de las variantes anti-TNF, -CD25, -EGFr, y -IgGE para FcRn humano se proporcionan en la Figura 12. Como se puede ver, las variantes mejoran la afinidad de FcRn en el contexto de los anticuerpos que se dirigen a una variedad de antígenos.

Ejemplo 5. Experimentos farmacocinéticos en ratones con FcRn humano genosuprimido

Para ensayar la capacidad de las variantes seleccionadas para mejorar la vida media in vivo, se realizaron experimentos farmacocinéticos en ratones B6 que eran homocigóticos genosuprimidos para FcRn murino y heterocigóticos genoactivados para FcRn humano (mFcRn^{-/-}, hFcRn⁺) (Petkova et al., 2006, Int Immunol 18(12):1759-69), en la presente memoria referido como hFcRn o hFcRn⁺ de ratón. Se proporcionó una inyección intravenosa única del anticuerpo anti-VEGF (2 mg/Kg) en la vena de la cola a grupos de 4-7 ratones hembra al azar por peso corporal (intervalo de 20-30g). Se extrajo sangre (~50ul) del plexo orbital en cada punto de tiempo, se procesó hasta el suero, y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Las duraciones del estudio fueron de 28 ó 49 días. A los animales no se les dañó durante estos estudios.

Se determinaron las concentraciones de anticuerpo empleando ensayos ELISA. En los primeros dos estudios (referidos como el Estudio 1 y el Estudio 2), se adherió a la placa anticuerpo Fc anti-humano de cabra (Jackson Immuno resaearch), los pocillos se lavaron con PBS (suero salino tamponado con fosfato con Tween 0,05%) y se bloqueó con BSA 3% en PBST. Se añadieron el suero o los estándares de calibración, seguido del lavado con PBST, la adición de europio marcado igG anti-humano (Perkin Elmer), y otro lavado con PBST. Se recogió la señal fluorescente en resolución de tiempos. Para los estudios 3-5, la concentración sérica se detectó empleando un ELISA similar, pero se empleó VEGF recombinante (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ) como reactivo de captura y la detección se llevó a cabo con anticuerpo kappa anti-humano biotinilado y estreptavidina marcada con europio. Los parámetros de PK se determinaron para los ratones individuales con un modelo no compartimental empleando WinNonLin (Pharsight Inc, Mountain View CA). Los tiempos nominales y las dosis se usaron con puntos de pesado uniformes. Los puntos de tiempo empleados (intervalos lambda Z) eran de 4 días al final del estudio, aunque todos los puntos de tiempo se usaron para los mutantes de aclaramiento más rápido, P257N y P257L.

Se llevaron a cabo estudios de PK de cinco anticuerpos en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. La Figura 13 muestra los datos de la concentración sérica para anticuerpos WT de variante IgG1 (Estudio 3) e IgG2 (Estudio 5), respectivamente. En la Figura 14 se muestran los parámetros PK a medida para todos los estudios de Pk in vivo que se llevaron a cabo en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. Los datos PK incluyen la vida media, que representa la fase beta que caracteriza la eliminación del anticuerpo a partir del suero, C_{max}, que representa la concentración sérica máxima observada, AUC, que representa el área bajo la curva del tiempo de concentración, y el aclaramiento, que representa el aclaramiento del anticuerpo a partir del suero. Para cada una de las variantes se proporciona también la mejora calculada o la reducción en la vida media relacionada para IgG1 o IgG2 del anticuerpo parental [Vida media = vida media (variante) / vida media (WT)].

Los datos muestran que varios de los anticuerpos con variantes de Fc por ingeniería con afinidad mejorada a FcRn a pH 6,0 prolongan la vida media in vivo. La Figura 15a muestra un gráfico de la vida media in vivo frente al número de veces de unión del FcRn para anticuerpos IgG1, con variantes seleccionadas marcadas. Los resultados de los experimentos repetidos (en círculo en la figura) indican que los datos son reproducibles a partir del modelo in vivo. Las mejores variantes individuales incluyen 308F y 434S, las mejores variantes dobles incluyen 259I/308F, 308F/428L, 308F/434S, y 428L/434S, y la mejor variable triple es 259I/308F/428L. Existe una correlación general entre la afinidad por FcRn y la vida media in vivo, pero no es predictiva completamente. Notablemente, las variantes 257L y 257N, con una unión a FcRn mejorada en 3,4 y 3,5 veces respectivamente, reducen la vida in vivo media en 0,6 y 0,3 respectivamente. La gráfica destaca también de nuevo la importancia de la identidad del aminoácido de sustitución en una posición dada –aunque 308F/434S proporciona una sustancial vida media mejorada, 308F/434M era apenas mejor que IgG1 WT.

La Figura 15b muestra una gráfica de la vida media in vivo frente al n° de veces de unión de FcRn para los anticuerpos variantes de IgG2 con las variantes marcadas. Cuando se comparan los datos de la IgG2 in vivo con los datos de la IgG1 in vivo (Figura 15c), se observó un resultado sorprendente. Las variantes proporcionaron sustancialmente una mayor mejora de la vida media in vivo en el contexto de una región Fc de IgG2 que de lo que lo hacen en una región Fc de IgG1. Las vidas medias más prolongadas de la variante en solitario y de la variante doble a partir de todos los anticuerpos en los cinco estudios fueron de 12,2 y 16,5, proporcionados por 434S IgG2 y 428L/434S respectivamente. La drástica mejora de las vidas medias para las variantes de IgG2 en relación con las IgG1 a pesar del hecho de que las mejoras por las variantes en IgG2 eran comparables incluso menores a las de IgG1 (434S IgG1 veces = 3,8, 434S IgG2 veces = 4,9, 428L/434S IgG1 veces = 17,3, 428L/434S IgG2 veces =

14,8). Por tanto, de forma inesperada, el anticuerpo IgG2 puede tener la mejor aplicación para las variantes Fc para mejorar las vidas medias in vivo en mamíferos.

Ejemplo 6. Variantes de inmunoadhesinas

5 Las variantes de Fc de la invención se ensayaron también por su capacidad para mejorar la vida media de inmunoadhesinas (también referidas como fusiones de Fc). Las variantes de Fc seleccionadas se prepararon por ingeniería en etanercept de inmunoadhesión anti-TNF (Enbrel®). El etanercept es una fusión del receptor 2 TNF humano (TNF RII) y la región Fc de la IgG1 humana, y está aprobada clínicamente para el tratamiento de la artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, y psoriasis. Se construyó una versión de la región IgG2 de esta fusión de Fc, así como se construyeron variantes de Fc seleccionadas en este contexto. En la Figura 16 se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las inmunoadhesinas anti-TNF caracterizadas en la invención. Los genes se construyeron empleando PCR recurrente y se subclonó en el vector pTT5, y las variantes de Fc se construyeron empleando métodos de mutagénesis QuikChange®. Las inmunoadhesinas se expresaron en células 293E y se purificaron como se describe anteriormente.

15 La especificidad de unión de las inmunoadhesinas purificadas se confirmó mediante ensayo de la unión recombinante TNF mediante Biacore. Las inmunoadhesinas se capturaron en una proteína A/G inmovilizada (Pierce) de un chip biosensor CM5 (Biacore®), generado empleando acoplamiento de amina primaria estándar. Las inmunoadhesinas se inmovilizaron en la superficie de la Proteína A/G, y se inyectaron diluciones en serie TNF recombinante sobre la superficie de unión al anticuerpo, seguido de un fase de disociación. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró con tampón. Los datos se procesaron mediante tiempo cero y la respuesta antes de la inyección del receptor y mediante sustracción a partir de un canal de referencia para contar los cambios debido a las inyecciones. Los datos cinéticos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 (Langmuir). En la Figura 17 se proporcionan las constantes de asociación de equilibrio (Kas) obtenidas de estos ajustes. Los resultados muestran que las inmunoadhesinas variantes retienen la afinidad por TNF, comparable a enbrel comercial.

25 Las variantes de inmunoadhesinas se ensayaron para la unión a FcRn humano a pH 6,0 empleando Biacore como se describe anteriormente. Los resultados (Figura 18) indican que, similar al contexto de anticuerpos, las variantes mejoran la unión a FcRn en relación a sus proteínas inmunoadhesinas IgG1 y IgG2 parentales.

30 Las vidas medias de las variantes de inmunoadhesinas se ensayaron en los ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺ como se describe anteriormente. 12 ratones por grupo se inyectaron a 2 mg/kg de la variante y la inmunoadhesina IgG1 parental. La concentración sérica se detectó empleando ELISA similar a la descrita anteriormente, excepto que se empleó el anticuerpo TNF RII anti-humano de cabra como reactivo de captura; la detección se llevó a cabo con anticuerpo kappa anti-humano biotinilado y con estreptavidina marcada con europio. La Figura 19 muestra datos de concentración sérica para las inmunoadhesinas de variantes de Fc y de Fc IgG1 WT. En la Figura 20 se proporcionan a partir del estudio PK los parámetros PK ajustados como se describe anteriormente. Para cada variante se proporciona también el % calculado del incremento de la vida media, calculado como 100 veces la vida media de la variante de fusión Fc sobre las de Fc IgG1 WT parental. Los resultados indican que las variantes prolongan la vida media in vivo en el contexto de la inmunoadhesina.

Ejemplo 7. Experimento farmacocinético en primates no humanos

40 Las propiedades PK de los productos biológicos en primates no humanos están bien establecidos por ser predictivos de sus propiedades en seres humanos. Se llevó a cabo un estudio PK en monos cynomolgus (*macaca fascicularis*) para evaluar la capacidad de las variantes de anticuerpos anti-VEGF para mejorar la vida media sérica en primates no humanos.

45 En la preparación para un estudio PK en monos cynomolgus (*cyno*), se midió la unión de las variantes de anticuerpo a cynomolgus FcRn (cFcRn) a pH 6,0. cFcRn se construyó, expresó y purificó como se describe anteriormente para FcRn humano. La unión de los anticuerpos variantes anti-VEGF a cFcRn se midió empleando Biacore como se describe anteriormente. Los datos se proporcionan en la Figura 21. Los resultados muestran que las variantes mejoran la afinidad por FcRn cyno de manera similar a la que lo hacen por FcRn humano. La disociación a pH mayor (7,4) era también muy rápida (datos no mostrados), similar al observado para la unión a FcRn humano. Estos resultados no sorprenden dada la alta homología de secuencia de los receptores humano y cyno (96% cadena alfa para FcRn, 91% beta-2-microglobulina).

50 La PK de las variantes se estudió in vivo en primates no humanos. Monos cynomolgus (*macaca fascicularis*, también llamado macaco cangrejero) macho de peso entre 2,3-5,1 kg se tomaron al azar por peso y se dividieron en 5 grupos con 3 monos por grupo. A los monos se les proporcionó una infusión de 4 mg/kg de anticuerpo venosa periférica durante 1 hora. A los monos se les extrajo muestras sanguíneas (1 ml) de una vena separada de 5 minutos a 90 días después de la finalización de la infusión, se procesó el suero y se almacenó a -70°C. Los animales no se dañaron durante estos estudios.

55 Las concentraciones de anticuerpos se determinaron empleando el método de captura VEGF como se describe anteriormente. Los parámetros PK se determinaron mediante el ajuste de las concentraciones frente al tiempo para un modelo no compartimental como se realizó en los estudios PK de ratón. Sin embargo, se emplearon los puntos

de tiempo desde el día 10 hasta el día 90 para las determinaciones de los parámetros PK. Los resultados PK se trazan en la Figura 22, y los parámetros ajustados se proporcionan en la Figura 23. Los resultados muestran que las variantes mejoran la vida media in vivo del anticuerpo hasta 3,2 veces. En el mejor caso (la variante 428L/434S) la vida media se prolongó desde 9,7 días hasta 31,1 días. Los resultados PK obtenidos en monos cynomolgus son coherentes con los obtenidos en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺, validando el modelo de ratón hFcRn como un sistema para ensayar las propiedades PK in vivo de las variantes, y apoyando las conclusiones de esos estudios.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> XENCOR, INC. LAZAR, GREGORY CHAMBERLAIN, AARON KEITH DAHIYAT, BASSIL I. DESJARLAIS, JOHN R. KARKI, SHER BAHADUR
- 10 <120> VARIANTES DE Fc CON UNIÓN ALTERADA A FcRn
 - <130> 5026-WO03
 - <140> PCT/US2008/088053
 - <141> 22-12-2008
 - <150> 61/016,793
 - <151> 26-12-2007
 - <150> 61/ 031,353
 - <151> 25-02-2008
 - <150> 61/046,353
 - <151> 18-04-2008
 - 20 <150> 61/050,172
 - <151> 02-05-2008
 - <150> 61/079,779
 - <151> 10-07-2008
 - <150> 61/099,178
 - 25 <151> 22-09-2008
 - <160> 35
 - <170> PatentIn versión 3.5
 - <210> 1
 - <211> 107
 - 30 <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1

ES 2 742 268 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

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

- <210> 2
- 5 <211> 330
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

ES 2 742 268 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 4
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

5

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

ES 2 742 268 T3

210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 5

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

ES 2 742 268 T3

<220>

<223> Cadena pesada constante IgG1/2 (CH1-bisagra-CH2-CH3))

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His

ES 2 742 268 T3

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IgG1 259I/308F

<400> 7

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

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

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

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

10

ES 2 742 268 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 8

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 742 268 T3

<220>

<223> IgG1 434S/428L

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IgG2 434S

<400> 9

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

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

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

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

10

ES 2 742 268 T3

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

- <210> 10
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> IgG2 434S/428L
- <400> 10

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

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

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

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

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 11

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IgG1/2 434S

<400> 11

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

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

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

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

10

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

- 5
- <210> 12
 - <211> 329
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> IgG1/2 434S/428L
 - <400> 12

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 180 185 190

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anti-VEGF VH

<400> 13

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

- 5 <210> 14
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Anti-VEGF VL

- 10 <400> 14

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 15
- <211> 121

ES 2 742 268 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Anti-TNF VH

5 <400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Anti-TNF VL

<400> 16

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Anti-CD25

10 <400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 106

ES 2 742 268 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Anti-CD25 VL

5 <400> 18

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Anti-EGFR VH

15 <400> 19

ES 2 742 268 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Thr Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

- 5 <210> 20
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Anti-EGFR VL

- 10 <400> 20

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 742 268 T3

<210> 21
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Anti-IgE VH

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110

10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Anti-IgE VL

<400> 22

ES 2 742 268 T3

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera anti-TNF

<400> 23

ES 2 742 268 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anti-TNF heavy chain IgG1 259/308F

<400> 24

ES 2 742 268 T3

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

ES 2 742 268 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 25

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada IgG1 434S/428L anti-TNF

<400> 25

ES 2 742 268 T3

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

ES 2 742 268 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu
420 425 430

His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada IgG2 434S anti-TNF

<400> 26

ES 2 742 268 T3

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

ES 2 742 268 T3

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 742 268 T3

<223> Anti-TNF heavy chain IgG2 434S/428L

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

ES 2 742 268 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada IgG1/2 434S anti-TNF

ES 2 742 268 T3

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

ES 2 742 268 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada IgG1/2 434S/428L anti-TNF

<400> 29

ES 2 742 268 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

ES 2 742 268 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His
420 425 430

Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 30

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión Fc Anti-TNF con IgG1 Fc

<400> 30

ES 2 742 268 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

ES 2 742 268 T3

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 31

<211> 488

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión Fc Anti-TNF con IgG2 Fc

<400> 31

ES 2 742 268 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

ES 2 742 268 T3

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 450 455 460

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 32

5 <211> 489

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG1 259I/308F Fc

ES 2 742 268 T3

<400> 32

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

ES 2 742 268 T3

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val
 290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His
 340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

ES 2 742 268 T3

<210> 33
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Fusión Fc Anti-TNFcon IgG1 428L/434S Fc

<400> 33

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

ES 2 742 268 T3

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 290 295 300
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 385 390 395 400
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

ES 2 742 268 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 34

<211> 488

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión Fc anti-TNF con IgG2 434S Fc

<400> 34

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

10

ES 2 742 268 T3

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380

ES 2 742 268 T3

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
435 440 445

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
450 455 460

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 35

<211> 488

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión Fc anti-TNF con IgG2 428L/434S Fc

<400> 35

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

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

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

10

ES 2 742 268 T3

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350

ES 2 742 268 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 450 455 460

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
 465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una variante de Fc de un polipéptido Fc IgG humano, donde dicha variante de Fc comprende 428L y 434S, en donde dicha variante de Fc muestra una unión incrementada a FcRn en comparación con dicho polipéptido Fc IgG humano, y en donde la numeración es según el índice EU de Kabat.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido Fc IgG humano se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.
3. La composición según la reivindicación 1 ó 2 en donde dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG1.
4. La composición según la reivindicación 1 ó 2 en donde dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG2.
- 10 5. La composición según la reivindicación 1 ó 2 en donde dicho polipéptido Fc IgG humano es IgG4.
6. La composición según la reivindicación 1, 2, 3, 4, ó 5 en donde dicha variante de Fc de un polipéptido Fc IgG humano es un anticuerpo de cadena pesada.
7. La composición según la reivindicación 1, 2, 3, 4, ó 5 en donde dicha variante de Fc del polipéptido Fc IgG humano es una fusión de Fc.
- 15 8. Un ácido nucleico que codifica una variante de Fc de un polipéptido Fc IgG humano, en donde dicha variante de Fc comprende 428L y 434S, en donde dicha variante de Fc muestra una unión aumentada a FcRn en comparación con dicho polipéptido Fc IgG humano, y en donde la numeración es según el índice EU de Kabat.
9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
- 20 10. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
11. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.

Figura 1

CH1																																			
Indice EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138														
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G														
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S														
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G														
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S														
Indice EU	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159														
IgG1	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N														
IgG2	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N														
IgG3	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N														
IgG4	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N														
Indice EU	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180														
IgG1	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y														
IgG2	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y														
IgG3	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y														
IgG4	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y														
Indice EU	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201														
IgG1	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N														
IgG2	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	N	F	G	T	Q	T	Y	T	C	N														
IgG3	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	T	C	N														
IgG4	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N														
Indice EU	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220																
IgG1	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	R	V	E	P	K	S	C															
IgG2	Y	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R	K	C	C																
IgG3	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L	K	T	P																
IgG4	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K	Y	G																
Bisagra																																			
Indice EU	221			222	223	224	225	226	227	228																									
IgG1	D			K	T	H	T	C	P	P																									
IgG2				V		E		C	P	P																									
IgG3	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P														
IgG4						P	P	C	P	S																									
Indice EU																																			
IgG1																																			
IgG2																																			
IgG3	P	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P														
IgG4																																			
Indice EU															229	230	231	232	233	234	235	236													
IgG1															C	P	A	P	E	L	L	G													
IgG2															C	P	A	P	P	V	A														
IgG3															E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P	A	P	E	L	L	G
IgG4															C	P	A	P	E	F	L	G													

Figura 1 (Continuación)

CH2		Indice EU	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	
IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P			
IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P			
IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P			
IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P			
CH2		Indice EU	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	
IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y			
IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y			
IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	K	W	Y			
IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y			
CH2		Indice EU	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	
IgG1	Y	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T			
IgG2	Y	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T			
IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T			
IgG4	Y	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T			
CH2		Indice EU	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	
IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K			
IgG2	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K			
IgG3	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K			
IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K			
CH2		Indice EU	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340		
IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K				
IgG2	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K				
IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K				
IgG4	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K				
CH3		Indice EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	
IgG1	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	Q	E	L	M	T	K	N		
IgG2	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N			
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N			
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N			
CH3		Indice EU	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	
IgG1	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E			
IgG2	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E			
IgG3	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E			
IgG4	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E			
CH3		Indice EU	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	
IgG1	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	O	S			
IgG2	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	O	S			
IgG3	S	S	G	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	O	S			
IgG4	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	O	S			
CH3		Indice EU	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	
IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S			
IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S			
IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	I	F	S			
IgG4	F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S			
CH3		Indice EU	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	
IgG1	C	S	V	M	H	E	A	J	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P		
IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P			
IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	R	F	T	Q	K	S	L	S	L	S	P			
IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L	P		
CH3		Indice EU	446	447																				
IgG1	G	K																						
IgG2	G	K																						
IgG3	G	K																						
IgG4	G	K																						

Figura 2**Cadena ligera constante kappa (Ck) (SEQ ID NO:1)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYLSSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada constante IgG1 (CH1-bisagra-CH2-Ch3) (SEQ ID NO:2)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

Cadena pesada constante IgG2 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:3)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
 GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

Cadena pesada constante IgG3 (CH1-bisagra-CH2-Ch3) (SEQ ID NO:4)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLDGTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRC
 PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYN
 TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFFCFSVMHEALHNRFQKLSLSLSPGK

Cadena pesada constante IgG4 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SLGK

Cadena pesada constante IgG1/2 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
 WLNKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SLSPGK

Figura 3

IgG1 259I/308F (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLFHDQ
WLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

IgG1 434S/428L (SEQ ID NO:8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

IgG2 434S (SEQ ID NO:9)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSLSL
SPGK

IgG2 434S/428L (SEQ ID NO:10)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSL
SPGK

IgG1/2 434S (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQ
WLNNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

IgG1/2 434S/428L (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQ
WLNNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

Figura 4

VH Anti-VEGF (SEQ ID NO:13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAA
DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGLTVTVSS

VL Anti-VEGF (SEQ ID NO:14)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK

VH Anti-TNF (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS

VL Anti-TNF (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK

VH Anti-CD25 (SEQ ID NO:17)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFSYRMHWVRQAPGQGLEWGMWINPSTGYTEYNQ
KFQGRVTITADKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLTVTVSS

VL Anti-CD25 (SEQ ID NO:18)

QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSISYMHWFQQKPGQSPQLLIYTTSNLASGVPARFSGSG
SGTDYTLTISLQPEDFAVYYCHQRSTYPLTFGSGTKLEIK

VH Anti-EGFR (SEQ ID NO:19)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSNYGVHWVRQAPGKGLEWGMIIWGGSTDYSTSL
KSRITISKDTSKQVLTMTNMDPVDATYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSS

VL Anti-EGFR (SEQ ID NO:20)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNLHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGS
SGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQNNWPTTFGQGTKLEIK

VH Anti-IgE (SEQ ID NO:21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNYNPSV
KGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTVSS

VL Anti-IgE (SEQ ID NO:22)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSDYDGDSDYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLESGVPSR
FSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Figura 5

Cadena ligera Anti-TNF (SEQ ID NO:23)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS
 GSGDTFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada Anti-TNF IgG1 2591/308F (SEQ ID NO:24)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTFHQQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada Anti-TNF IgG1 434S/428L (SEQ ID NO:25)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada Anti-TNF IgG2 434S (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada Anti-TNF IgG2 434S/438L (SEQ ID NO:27)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada Anti-TNF IgG1/2 434S (SEQ ID NO:28)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

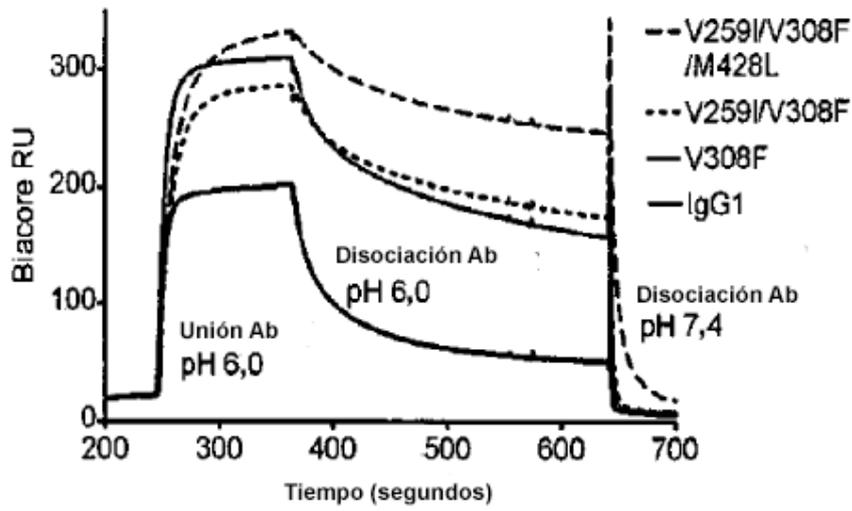


Figura 8

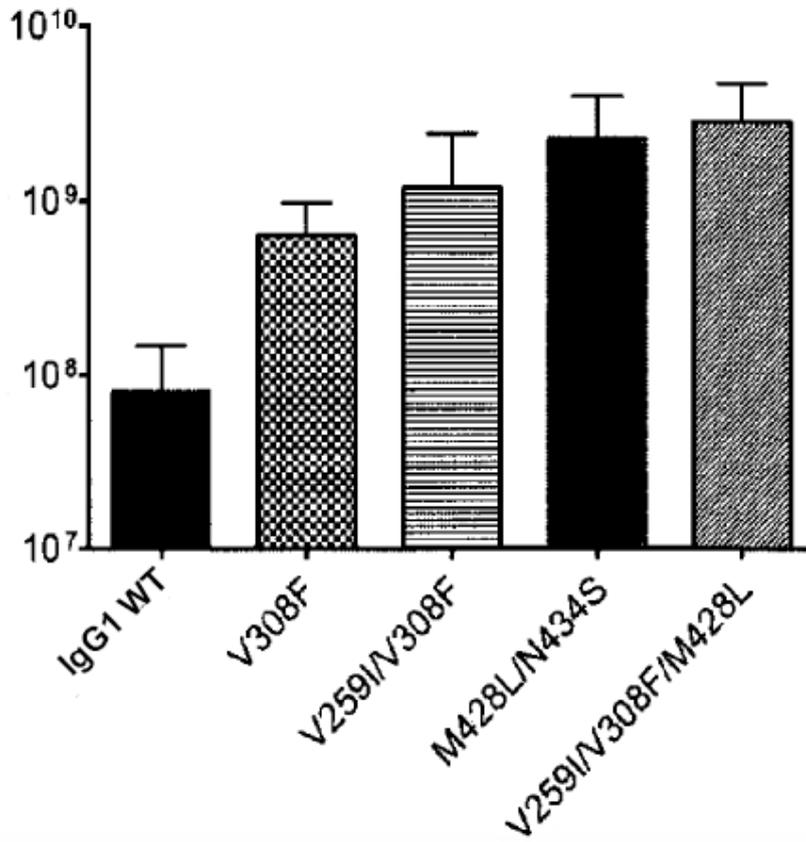


Figura 9

Variante	IgG	Fv	n	n° veces FcRn Media	SD
WT	IgG1	Anti-VEGF		1,00	
T250I	IgG1	Anti-VEGF	1	1,31	
M252Q	IgG1	Anti-VEGF	5	2,36	3,07
M252Y	IgG1	Anti-VEGF	2	4,82	0,62
M252E	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252P	IgG1	Anti-VEGF	1	0,03	
M252R	IgG1	Anti-VEGF	1	0,02	
M252D	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252K	IgG1	Anti-VEGF	1	0,64	
R255Y	IgG1	Anti-VEGF	1	1,24	
P257L	IgG1	Anti-VEGF	1	3,39	
P257N	IgG1	Anti-VEGF	1	3,53	
V259I	IgG1	Anti-VEGF	2	1,14	0,19
V259F	IgG1	Anti-VEGF	1	1,44	
V259G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259H	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259M	IgG1	Anti-VEGF	1	0,68	
V259N	IgG1	Anti-VEGF	1	1,87	
V259S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259W	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	3,41	
T307N	IgG1	Anti-VEGF	1	0,83	
T307G	IgG1	Anti-VEGF	1	1,72	
V308F	IgG1	Anti-VEGF	6	4,96	1,06
Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	1,43	
Y319I	IgG1	Anti-VEGF	2	1,48	0,53
Y319A	IgG1	Anti-VEGF	1	2,66	
Y319G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319H	IgG1	Anti-VEGF	1	1,81	
Y319M	IgG1	Anti-VEGF	1	1,95	
Y319N	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319Q	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319V	IgG1	Anti-VEGF	1	2,03	

Figura 9 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	nº de veces	
				FcRn Media	SD
Y319W	IgG1	Anti-VEGF	1	1,51	
E380A	IgG1	Anti-VEGF		ND	
E380Q	IgG1	Anti-VEGF	1	2,01	
E380R	IgG1	Anti-VEGF	1	3,41	
E380S	IgG1	Anti-VEGF	1	2,55	
E380V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	3,00	0,37
N434A	IgG1	Anti-VEGF	4	2,15	0,54
N434S	IgG1	Anti-VEGF	6	3,77	0,79
N434M	IgG1	Anti-VEGF	3	4,83	1,23
N434T	IgG1	Anti-VEGF	1	3,32	
N434V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
P245G/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	2,89	
T250I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	6,75	0,10
T250Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	6,30	0,82
M252Y/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	3,56	
M252Q/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	0,14	
M252Q/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	0,43	
M252Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	1,04	
M252Y/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9,63	0,32
M252Q/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	0,21	
M252Y/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2,37	
M252Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	0,35	
M252Y/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	5,32	
M252Y/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11,94	
M252Y/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	11,46	2,73
M252Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0,20	
M252Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0,48	
M252Y/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	2,79	
M252Y/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	61,60	
S254T/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3,56	
T256V/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5,04	1,94
T256E/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	35,53	
V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	12	9,79	2,72
V259A/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	4,81	
V259L/V308F	IgG1	Anti-VEGF		ND	

Figura 9 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces FcRn	
				Media	SD
V259I/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2,00	
V259I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4,53	
V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	5,67	
V259I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0,87	
V259I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	24,81	
L306I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	7,92	
T307P/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3,17	
T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5,57	0,69
T307S/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	5,22	
T307Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	7,25	
T307Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	14,18	
T307Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1,99	
T307Q/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	50,43	
V308F/L309Y	IgG1	Anti-VEGF	1	5,37	
V308F/L309N	IgG1	Anti-VEGF	1	1,00	
V308F/Q311P	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	2	5,84	0,30
V308F/Y319F	IgG1	Anti-VEGF	1	3,10	
V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	4	13,71	2,13
V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	2	4,20	0,78
V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14,63	0,28
V308F/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	41,55	
Q311A/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	27,42	
Y319I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	3	4,93	0,82
Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4,70	
Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	4,22	
Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4,42	
Y319I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	12,74	
M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	14	17,28	6,70
M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1,88	
M428L/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	39,54	
N434S/Y436F	IgG1	Anti-VEGF	1	4,43	
N434S/Y436M	IgG1	Anti-VEGF	1	2,58	
T250I/V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	11,29	
T250Q/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	17,08	
T250I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12,26	

Figura 9 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn Media	SD
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-VEGF	10	11,37	2,90
M252Q/V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0,65	
M252Y/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10,62	
M252Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	2,37	
M252Y/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	11,09	
M252Y/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12,13	
M252Q/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	1,90	
V259I/T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	7,40	1,54
V259I/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	3,53	
V259I/V308F/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	4,10	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	13	19,94	10,46
V259I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	3	10,86	3,38
V259I/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	7,06	
V259I/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7,90	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	9,57	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	11,91	
T307Q/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	4,24	
T307Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4,04	
V308F/Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10,20	
V308F/Y319L/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/Y319L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	12,39	5,63
V308F/Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3,78	
V308F/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	5	16,68	4,89
V308F/M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	8,14	
Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	13,90	
M252Y/S254T/T256E/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11,37	
M252Y/S254T/T256E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	10,29	2,99
M252Y/S254T/T256E/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9,84	4,04
M252Y/S254T/T256E/M428L	IgG1	Anti-VEGF	2	11,43	6,01
M252Y/S254T/T256E/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	13,50	
M252Y/S254T/T256E/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3,62	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	24,22	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14,23	0,75
V308F/Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	10,37	
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7,21	

Figura 10

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG2	Anti-VEGF		1,00	
V259I	IgG2	Anti-VEGF	1	1,02	
V308F	IgG2	Anti-VEGF	2	3,66	2,07
M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	4,19	
N434A	IgG2	Anti-VEGF	1	3,83	
N434S	IgG2	Anti-VEGF	2	4,88	1,05
N434G	IgG2	Anti-VEGF	1	1,60	
N434H	IgG2	Anti-VEGF	1	1,45	
N434M	IgG2	Anti-VEGF	1	1,51	
N434T	IgG2	Anti-VEGF	1	1,22	
N434Y	IgG2	Anti-VEGF	1	21,39	
N434D	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434E	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434F	IgG2	Anti-VEGF	1	16,79	
N434K	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434P	IgG2	Anti-VEGF	1	0,26	
N434R	IgG2	Anti-VEGF	1	0,44	
N434V	IgG2	Anti-VEGF	1	0,48	
N434W	IgG2	Anti-VEGF	1	39,81	
T250Q/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	7,62	
V259I/V308F	IgG2	Anti-VEGF	1	6,58	
V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	16,13	
V308F/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	16,36	
M428L/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	14,80	
M252Y/S254T/T256E	IgG2	Anti-VEGF	1	8,34	
V259I/V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	15,29	

Figura 10 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	nº de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1/2	Anti-VEGF		1,00	
N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,28	
L251A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,65	
L251F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,95	
L251I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,28	
L251M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,83	
L251N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,34	
L251V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,31	
R255H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,23	
R255Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,53	
T307I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,09	
T307V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,25	
Q311A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,35	
Q311D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,39	
Q311E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,94	
Q311F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,95	
Q311G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,26	
Q311I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	15,81	
Q311K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,57	
Q311L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9,00	
Q311M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9,12	
Q311N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,27	
Q311P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,56	
Q311R/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,96	
Q311T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,17	
Q311V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	14,17	
Q311W/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,97	
Q311Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,65	
L314F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,35	
L314I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,54	
L314M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,05	
L314Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,75	
L314V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,34	
H429N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,78	
H429V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,69	
E430A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,24	
E430D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,79	

Figura 10 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces FcRn	
				Media	SD
E430F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,79	
E430I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,27	
E430L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,40	
E430Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,20	
E430S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,58	
E430T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,37	
A431F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,21	
A431G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,31	
A431H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6,29	
A431N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,06	
A431S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,18	
A431T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,46	
A431V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,64	
L432A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,63	
L432F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,14	
L432G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,71	
L432H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,69	
L432I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,96	
L432N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,43	
L432Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,59	
L432V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,24	
H433A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,41	
H433D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,75	
H433E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,73	
H433F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,76	
H433I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,94	
H433K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,65	
H433L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,14	
H433M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,91	
H433P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6,33	
H433S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3,68	
H433T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,88	
H433V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,41	
H433Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,56	
N434S/Y436A	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,03	
N434S/Y436D	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1,79	
N434S/Y436E	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,36	

Figura 10 (Continuación)

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces FcRn	
				Media	SD
N434S/Y436G	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,24	
N434S/Y436H	IgG1/2	Anti-VEGF	1	7,63	
N434S/Y436I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	30,57	
N434S/Y436K	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9,00	
N434S/Y436L	IgG1/2	Anti-VEGF	1	12,81	
N434S/Y436N	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0,39	
N434S/Y436Q	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,14	
N434S/Y436R	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5,60	
N434S/Y436S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6,67	
N434S/Y436T	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4,71	
N434S/Y436V	IgG1/2	Anti-VEGF	1	17,46	
N434S/Y436W	IgG1/2	Anti-VEGF	1	19,47	
N434S/T437I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2,96	
G236R/L328R	IgG1	Anti-VEGF	1	1,25	
V308F/I332E	IgG1	Anti-VEGF	1	4,16	
I332E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	3,91	
G236A/V308F/I332E	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	1,82	
G236A/I332E/N434S	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	3,87	

Figura 11a

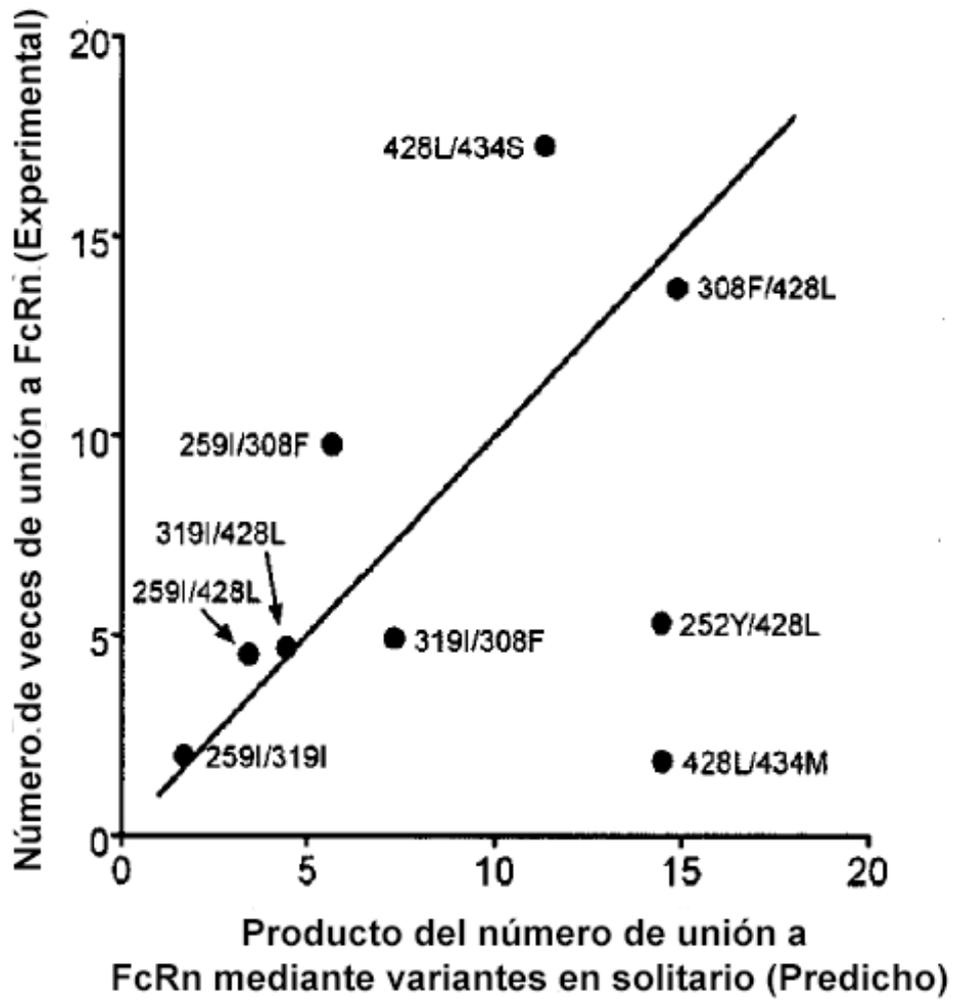


Figura 11b

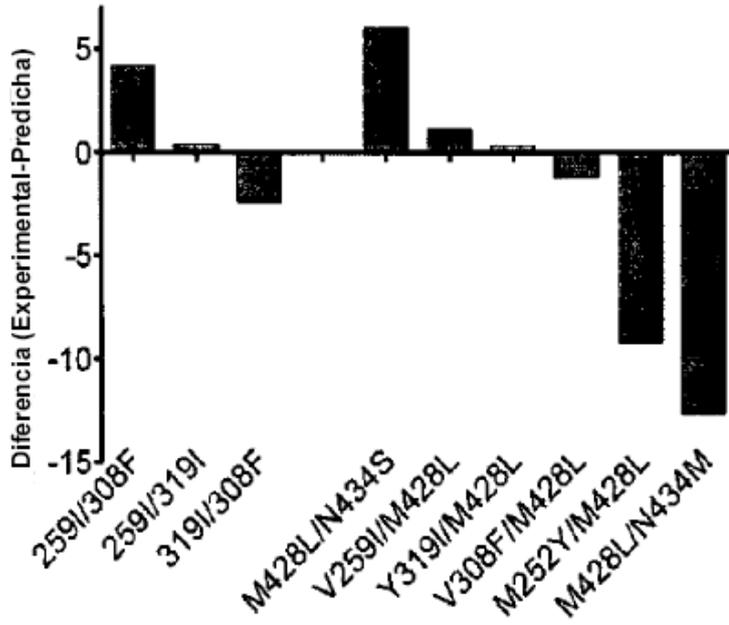


Figura 11c

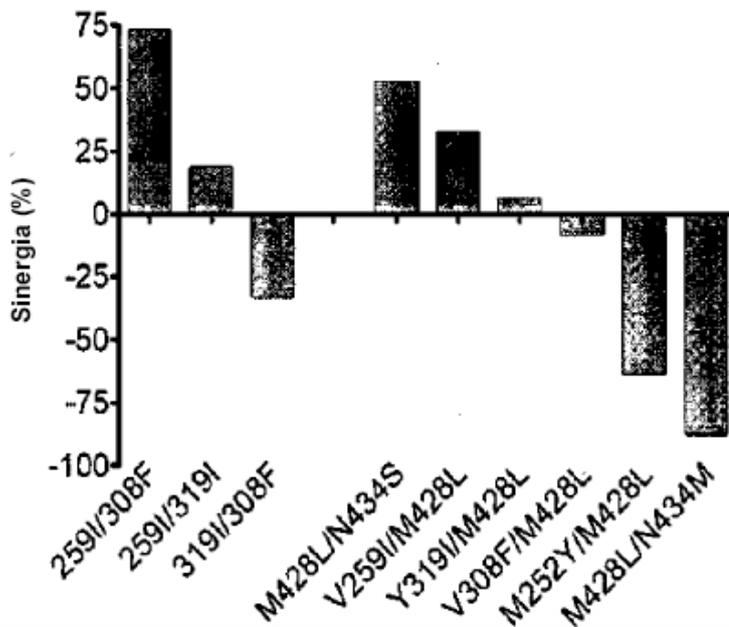


Figura 12a

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-TNF		1,00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-TNF	3	13,25	5,09
M428L/N434S	IgG1	Anti-TNF	2	19,76	4,42
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-TNF	2	49,85	5,09
G236R/L328R	IgG1	Anti-TNF	1	0,99	
WT	IgG2	Anti-TNF		1,00	
N434S	IgG2	Anti-TNF	2	3,12	0,79
M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	3	19,99	8,69
L328R	IgG2	Anti-TNF	1	0,97	
L328R/M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	1	19,67	
WT	IgG1/2	Anti-TNF		1,00	
N434S	IgG1/2	Anti-TNF	2	7,22	0,16
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	3	25,39	5,13
L328R	IgG1/2	Anti-TNF	1	1,87	
L328R/M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	1	39,90	

Figura 12b

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-CD25		1,00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-CD25	1	3,49	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-CD25	1	19,97	
WT	IgG1/2	Anti-CD25		1,00	
N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	5,16	
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	28,00	

Figura 12c

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-EGFR		1,00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-EGFR	3	14,23	8,51
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-EGFR	2	32,96	20,16
WT	IgG1/2	Anti-EGFR		1,00	
N434S	IgG1/2	Anti-EGFR	1	1,61	
N434S/M428L	IgG1/2	Anti-EGFR	1	5,93	

Figura 12d

Variante	IgG	Fv	n	n° de veces	
				FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-IgE		1,00	
M428L	IgG1	Anti-IgE	1	3,06	
N434S	IgG1	Anti-IgE	1	4,38	
V259I/V308F	IgG1	Anti-IgE	1	8,34	
V308F/Y319I	IgG1	Anti-IgE	1	5,39	
V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	14,25	
M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	12,63	
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-IgE	1	9,56	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	20,27	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	27,29	

Figura 13a

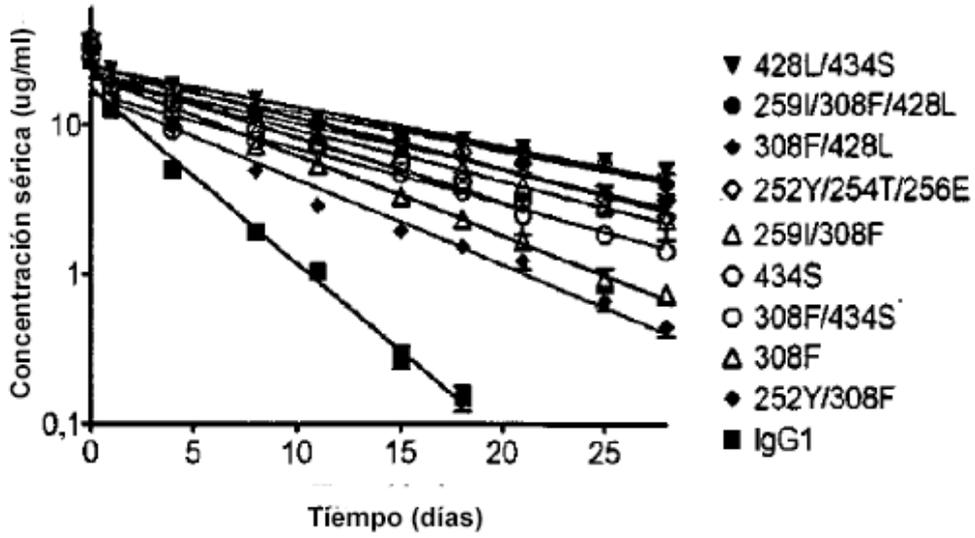


Figura 13b

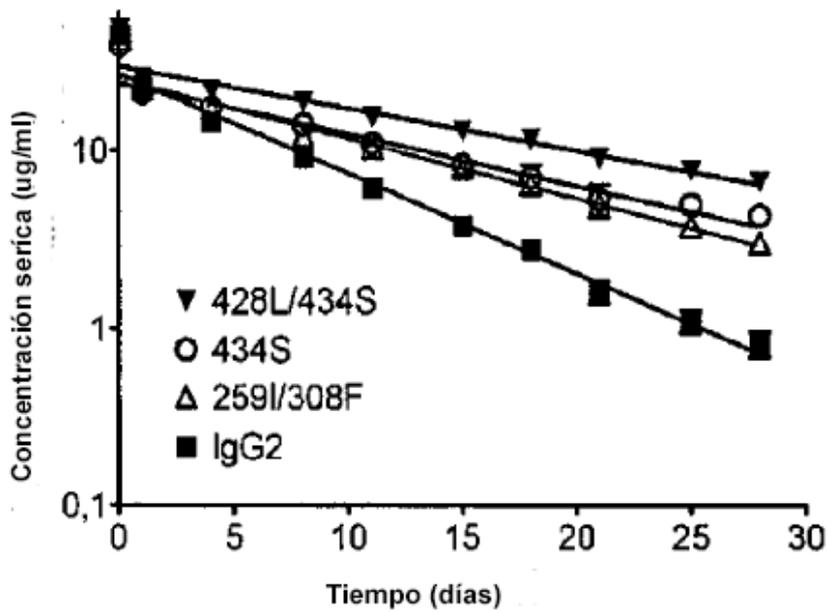


Figura 14

Variante de Fc	IgG	n	Vida media (día)			Cmax (ug/mL)		AUC (día *ug/mL)		Aclaramiento (mL/día/kg)	
			Media	SD	n° de veces	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Estudio 1											
WT (Nativo IgG1)	IgG1	6	3	0,5	1,0	28,5	7,3	69,8	8,4	29,1	4,2
P257L	IgG1	6	1,9	0,4	0,6	18,1	8,4	38	11,3	59,5	28,8
P257N	IgG1	6	0,9	0,1	0,3	30,1	4,7	38,2	6,1	53,4	8,8
V308F	IgG1	6	4,9	0,3	1,6	30,1	9,4	129,2	11	15,6	1,3
T250Q/M428L	IgG1	6	8,4	2,8	2,8	22,3	3,8	186	52,5	12	5,4
M252Y/S254T/T256E	IgG1	4	10,9	1,2	3,6	34,6	10,1	330,8	57,3	6,2	1,1
N434A	IgG1	6	5,5	2,1	1,8	24,5	6,2	143,1	26,9	14,3	2,2
Estudio 2											
WT (Nativo IgG1)	IgG1	7	3,9	0,52	1,0	36	5,6	92	13	22	2,9
V308F	IgG1	7	6,8	0,99	1,7	28	8,7	152	34,6	14	3,4
M252T/S254T/T256E	IgG1	7	11,3	1,2	2,9	25	7	241	64,2	8,9	2,6
Estudio 3											
WT (Nativo IgG1)	IgG1	6	2,8	0,3	1,0	27	6	69	10	29,4	4,6
V308F	IgG1	6	5,9	0,4	2,1	33	3	173	33	11,8	1,9
M252T/S254T/T256E	IgG1	6	10,4	1,5	3,7	34	6	317	67	6,6	1,5
N434S	IgG1	6	7,7	1,5	2,8	33	11	228	75	10	4,6
V259I/V308F	IgG1	6	9,2	1,5	3,3	36	5	262	47	7,9	1,4
V308F/M428L	IgG1	6	11,2	1,1	4,0	38	6	307	50	6,7	1,1
M252Y/V308F	IgG1	6	5,7	0,4	2,0	40	6	140	24	14,7	2,6
M428L/N434S	IgG1	6	12	2,9	4,3	37	9	400	112	5,5	2
V308F/N434S	IgG1	6	8,6	0,3	3,1	28	3	195	25	10,4	1,3
V259I/V308F/M428L	IgG1	6	13,3	2,7	4,8	37	6	383	68	5,3	0,8

Figura 14 (continuación)

Variante de Fc	IgG	n	Vida media (día)			C _{max} (ug/mL)		AUC (día*ug/mL)		Aclaramiento (mL/día/kg)	
			Media	SD	n° de veces	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Estudio 4											
WT (Nativo IgG1)	IgG1	6	2,9	0,4	1,0	32,5	3,1	72,7	5,8	27,6	2,3
M252Y/S254T/T256E	IgG1	6	11,3	1,8	3,9	40,6	5,8	378,5	60,7	5,4	0,8
V308F/N434M	IgG1	6	4,9	0,8	1,7	38,6	5,4	153,6	21,3	13,2	1,9
V259I/V308F	IgG1	6	7,5	0,8	2,6	37,9	3,8	234,5	23,1	8,6	0,9
V308F	IgG1	6	6,1	0,4	2,1	37,8	1,9	172,2	16,7	11,7	1,2
V308F/Y319I	IgG1	6	6	0,5	2,1	38,1	6,5	206,5	71	10,5	3,1
M428L/N434S	IgG1	6	11,8	0,6	4,1	42	4,6	392,4	52,2	5,2	0,7
V308F/M428L/N434S	IgG1	6	9	0,4	3,1	31,8	7,9	204,6	34,2	10	1,8
V259I/V308F/N434S	IgG1	6	8,5	1,8	2,9	33,4	7,3	254,9	29	7,9	0,9
V259I/V308F/M428L	IgG1	6	10,9	0,6	3,8	35	7,5	295,1	54,5	7	1,3
Estudio 5											
WT (Nativo IgG2)	IgG2	6	5,9	0,9	1,0	43,8	5	212,3	33,8	9,6	1,5
N434S	IgG2	6	12,2	1,3	2,1	39,1	6,4	381,6	91,6	5,5	1,2
V259I/V308F	IgG2	6	10,2	0,6	1,7	42,3	1,3	342	21,2	5,9	0,4
M428L/N434S	IgG2	6	16,5	1,1	2,8	48	5,8	603,3	72,9	3,4	0,4

Figura 15a

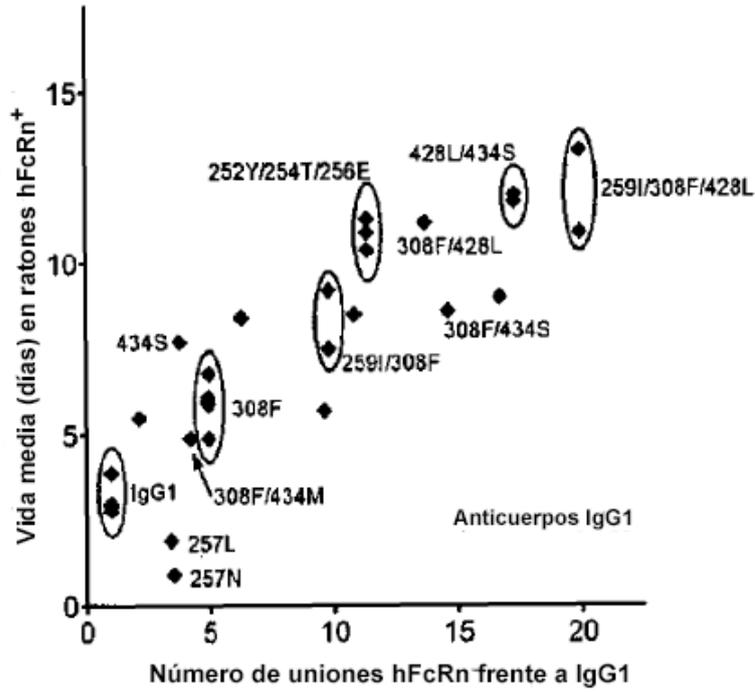


Figura 15b

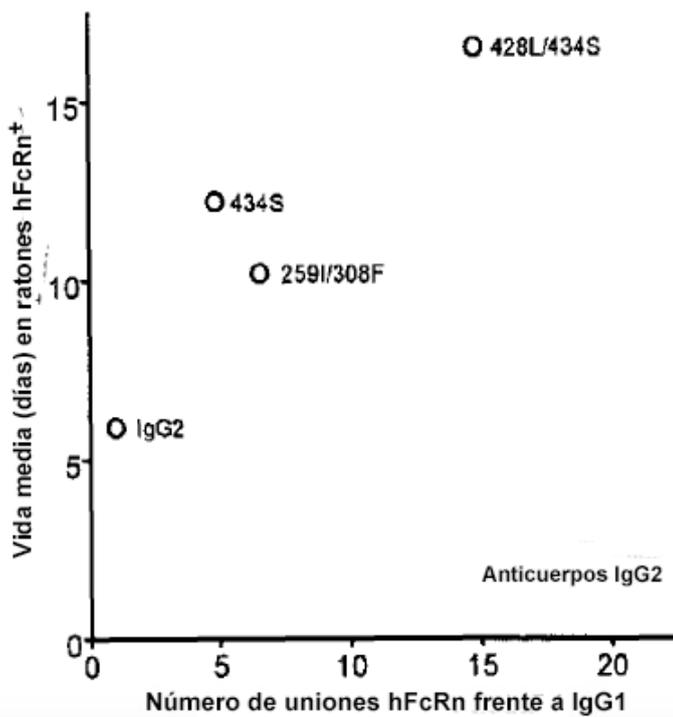


Figura 15c

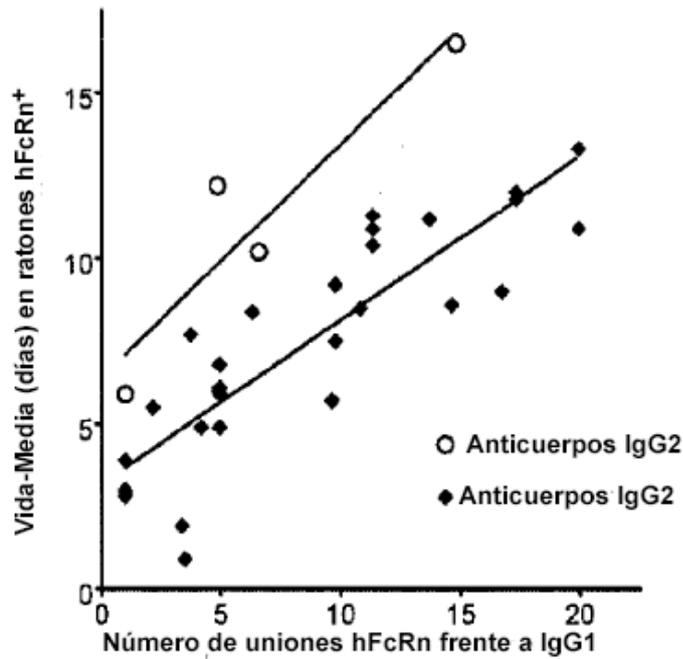


Figura 16

Fusión de Fc ANti-TNF con Fc IgG1

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCCKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDDVCKPCAPGTFSTNTSSDIDCRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Fusión de Fc Anti-TNF con Fc IgG2

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCCKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDDVCKPCAPGTFSTNTSSDIDCRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Figura 16 (Continuación)

Fusión de Fc Anti-TNF con Fc IgG1 259I/308F (SEQ ID NO:32)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTTSSDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLFHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fusión de Fc Anti-TNF con Fc IgG1 428L/343S (SEQ ID NO:33)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTTSSDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQLDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSVSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Fusión de Fc Anti-TNF con Fc IgG2 434S (SEQ ID NO:34)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTTSSDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQLDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Fusión con Fc Anti-TNF con Fc IgG2 428L/434S (SEQ ID NO:35)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFSTNTTSSDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQLDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSVSLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 17

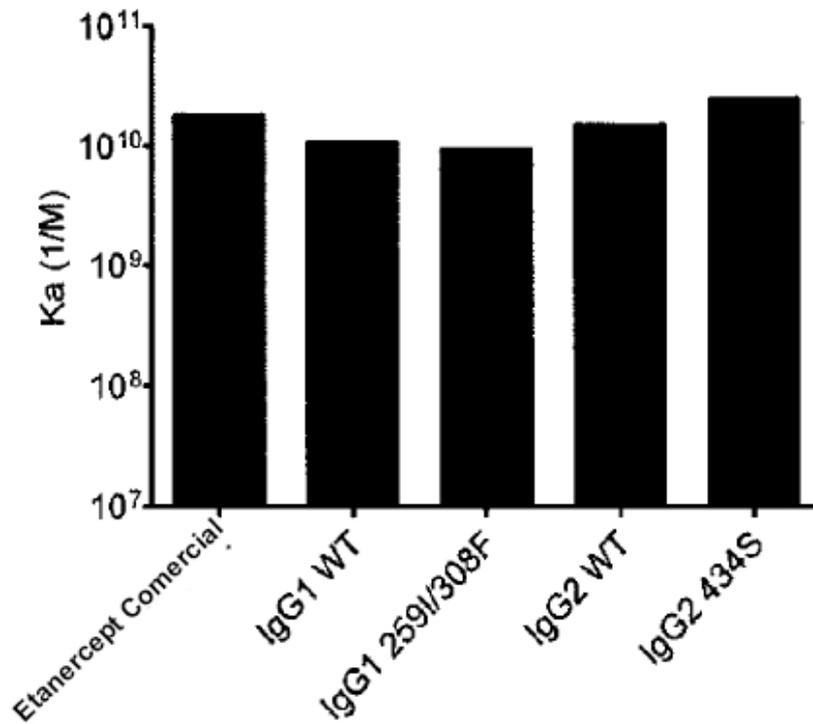


Figura 18

Variante	Región Fc	Pareja de fusión	n	nº de veces FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	TNFR	1	1,00	
V259I/V308F	IgG1	TNFR	4	4,86	2,22
M428L/N434S	IgG1	TNFR	2	7,24	1,57
WT	IgG2	TNFR	1	1,00	
N434S	IgG2	TNFR	3	6,93	2,02
M428L/N434S	IgG2	TNFR	3	11,78	4,33

Figura 19

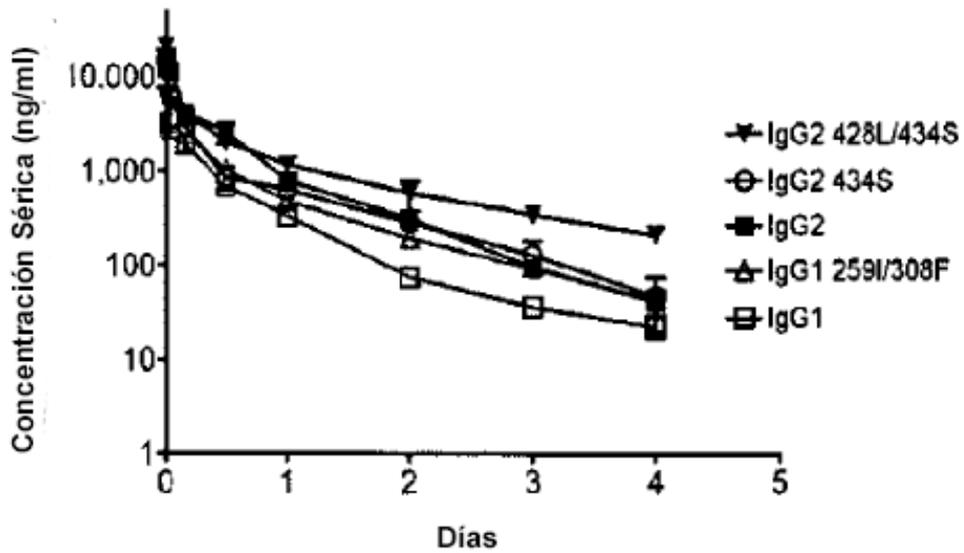


Figura 20

Variante Fc	Fc	n	Vida-media (día) incremento		Cmax (%) (ng/mL)	AUC (día*ng/mL)	Aclaramiento (mL/día/kg)
WT	IgG1	12	0,60	n/a	22253,3	1324,7	1177,7
V259I/V308F	IgG1	12	0,81	136	12175,6	2291,5	741,9
WT	IgG2	12	0,65	n/a	14580,2	3686,3	423,2
N434S	IgG2	12	0,77	119	12086,8	2531,3	655,8
M428L/N434S	IgG2	12	1,01	156	30676,7	4405,2	354,1

Figura 21a

	Número de veces FcRn cyno			Número de veces FcRn humano		
	n	Media	SD	n	Media	SD
WT IgG1		1,00			1,00	
M252Y/S254T/T256E	2	11,95	2,23	10	11,37	2,90
V259I/V308F	2	8,80	1,86	12	9,79	2,72
M428L/N434S	3	12,18	1,23	14	17,28	6,70
V259I/V308F/M428L	4	12,43	0,57	13	19,94	10,46

Figura 21b

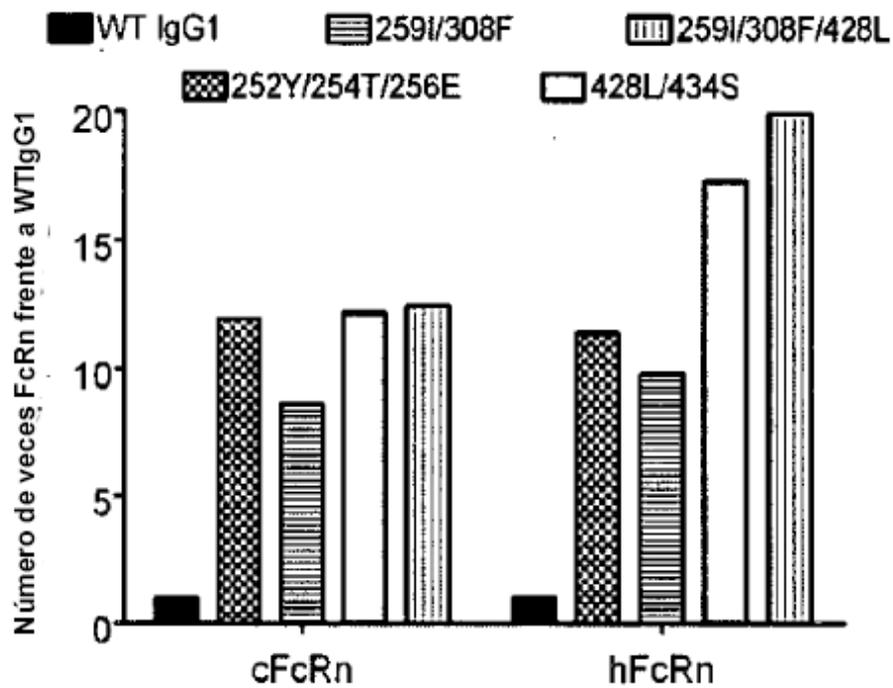


Figura 22

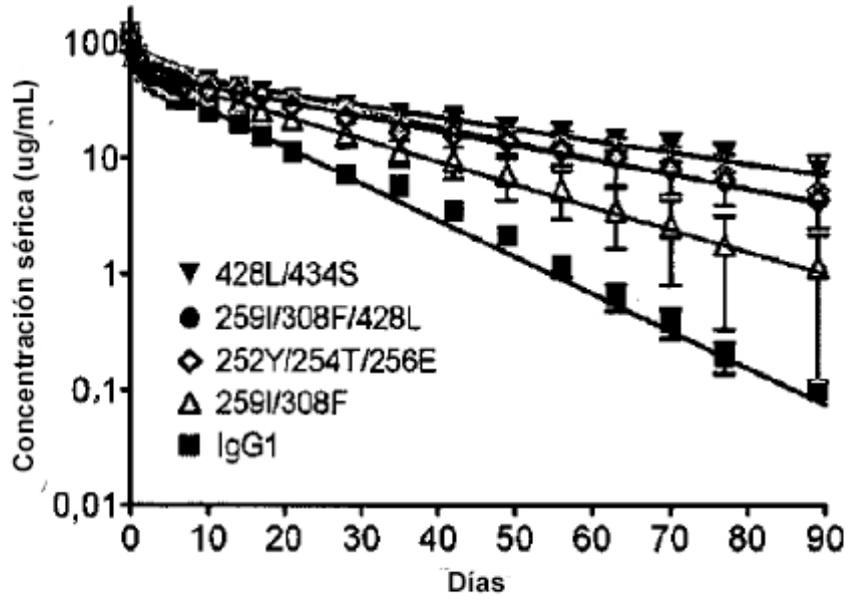


Figura 23

Variante de Fc	IgG	n	Vida-Media			Cmax		AUC		Aclaramiento	
			(día)			(ug/mL)		día *ug/mL		mL/día/kg	
			Media	SD	nº de veces	Media	SD	Media	SD	Media	SD
WT (Nativo IgG1)	IgG1	3	9,7	1,0	101,2		822,9		4,9		
M252Y/S254T/T256E	IgG1	3	24,2	1,6	2,5	111,2	13,9	1919	210,1	2,1	0,2
V259I/V308F	IgG1	3	16,2	6,4	1,7	102,8	3,2	1352,6	367	3,1	0,9
M428L/N434S	IgG1	3	31,1	7,9	3,2	126	17	2660,9	791	1,6	0,6
V259I/V308F/M428L	IgG1	3	25,1	5,9	2,6	124,6	14,3	2301,6	922,5	1,9	0,8