

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 103**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/US2013/036872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13165690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13784604 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2844289**

54 Título: **Moléculas con función efectora reducida y semividas prolongadas, composiciones y usos de las mismas**

30 Prioridad:

30.04.2012 US 201261640327 P

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

04.03.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**TSUI, PING;
BORROK, MARTIN y
DALL'ACQUA, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 746 103 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

Moléculas con función efectora reducida y semividas prolongadas, composiciones y usos de las mismas.

Campo

- 5 La presente divulgación se refiere a moléculas, en particular polipéptidos, que incluyen pero no se limitan a inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden un dominio Fc de IgG variante que comprende mutaciones que dan como resultado una función efectora reducida y una semivida prolongada manteniendo una estabilidad favorable. La divulgación también comprende ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, vectores de expresión, células huésped y métodos para fabricarlos y usarlos, incluidas composiciones terapéuticas y de diagnóstico, formulaciones y kits.
- 10 Antecedentes de la técnica
- Los anticuerpos están formados por dos regiones distintas, denominadas regiones variable (Fv) y constante (Fc). La región Fc de un anticuerpo interactúa con una serie de ligandos, tales como los receptores Fc y C1q, impartiendo una serie de capacidades funcionales denominadas funciones efectoras. Los receptores Fc median la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmune (Raghavan et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:181-220 (1996); Ravetch et al., *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290, (2001)).
- 15 La formación del complejo Fc/FcγR por lo general da como resultado eventos de señalización dentro de estas células y respuestas inmunes posteriores tales como liberación de mediadores de inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas inespecíficas que expresan FcγR reconocen un anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Ghetie et al., *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000); Ravetch et al., *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290 (2001)).
- 20 Los FcγR humanos se dividen en tres clases distintas: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Las moléculas de IgG presentan especificidad de isotipo diferencial para FcγR. Las moléculas de IgG3 se unen fuertemente a todas las isoformas de FcγR. La IgG1, la isoforma más prevalente en la sangre, se une a todos los FcγR, aunque con una menor afinidad por las isoformas FcγRIIA/β. IgG4 es un aglutinante intermedio para FcγRI y un aglutinante débil para FcγRIIB. Finalmente, IgG2 se une solo débilmente a una forma alélica de FcγRIIA (FcγRIIA-H131) (Siberil et al., *J. Immunol. Lett.* 106:111-118 (2006)). Un corto tramo continuo de residuos de aminoácidos (234-238) de la parte N-terminal de la región CH2 está directamente implicado en la unión a todos los FcγR. Los residuos 268, 297, 327 y 329 también pueden impactar la unión a un subconjunto de FcγR, y los residuos múltiples ubicados en las regiones CH2 y CH3 también contribuyen a la unión de FcγR (Canfield et al., *J. Exp. Med.* 173:1483-91 (1991), Chappel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9036-40 (1991), Gergely et al. *FASEB J.* 4:3275-83 (1990)).
- 25 Un sitio superpuesto en la región Fc de la molécula controla activación de una función citotóxica independiente de la célula mediada por el complemento. De acuerdo con lo anterior, la unión de Fc a la proteína del complemento C1q media en un procedimiento llamado citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (véase Ward et al., *Ther. Immunol.* 2:77-94 (1995)).
- 30 En ciertos casos, es ventajoso disminuir o eliminar la función efectora. En estos casos, el uso de anticuerpos o fragmentos que contienen el dominio Fc que reclutan mal células complementarias o efectoras es beneficioso (véase, por ejemplo, Wu et al., *Cell Immunol.* 200:16-26 (2000); Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); la Patente de los Estados Unidos No. 6,194,551; la Patente de los Estados Unidos No. 5,885,573; la Publicación PCT WO 04/029207; y la Publicación de los Estados Unidos No. 2011/0059078).
- 35 Aunque ciertas subclases de inmunoglobulinas humanas reclutan pobremente células complementarias o efectoras, por ejemplo IgG2 e IgG4, no se conocen inmunoglobulinas de origen natural que carezcan de todas las funciones efectoras. De este modo, un enfoque alternativo es diseñar o mutar residuos en la región Fc que son responsables de la función efectora. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO2006076594, WO199958572, WO2006047350, y WO2006053301; la Patente de los Estados Unidos Pub. No. 2006-0134709; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,624,821, 6,194,551, y 5,885,573; Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624 (1999); Reddy et al., *J. Immunol.* 164:1925-1933 (2000); Xu et al., *Cell Immunol.* 200:16-26 (2000); Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001).
- 40 El documento WO2009003019 describe mutaciones en la región Fc de anticuerpos que proporcionan una mayor eficacia del anticuerpo. El documento US2007009523 describe diferentes residuos para ser alterados en la región Fc de los anticuerpos con el fin de disminuir la unión a C1q.
- 45 Una consideración para la reducción o eliminación de la función efectora es que no se perturben otras propiedades importantes de anticuerpos. De este modo, las variantes de Fc se deben diseñar para que solo se ablaionen la unión a FcγR y/o C1q, mientras se mantiene la estabilidad, la solubilidad y la integridad estructural de los
- 50
- 55

anticuerpos, así como la capacidad de interactuar con otros ligandos de Fc importantes tales como FcRn y proteínas A y G.

La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos o realizaciones establecidos en este documento que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información.

5 Breve resumen

La presente divulgación está dirigida a polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio Fc variante con sustituciones de aminoácidos que dan como resultado propiedades deseadas, por ejemplo, función efectora reducida y semivida en plasma mejorada, mientras se mantiene la estabilidad, por ejemplo, estabilidad térmica. En algunos aspectos, el polipéptido de la divulgación comprende un dominio Fc de IgG variante, en el que el dominio Fc de IgG variante comprende (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; (b) un aminoácido alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q) o valina (V) en la posición 235; y, (c) una alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N) o aminoácido glutamina (Q) en la posición 322; o, un aminoácido alanina (A) o glicina (G) en la posición 331, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En otros aspectos, el polipéptido comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos, el polipéptido comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; y un aminoácido glicina (G) en la posición 331, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos, el polipéptido comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido alanina (A) en la posición 235; y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En algunos aspectos, el polipéptido comprende además (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, o un aminoácido serina (S) en la posición 252, o un aminoácido triptófano (W) en la posición 252 o un aminoácido treonina (T) en la posición 252; y/o (b) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y/o (c) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, o un aminoácido serina (S) en la posición 256, o un aminoácido arginina (R) en la posición 256, o un aminoácido glutamina (Q) en la posición 256, o un aminoácido aspartato (D) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En otros aspectos, el polipéptido comprende además (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252; y/o (b) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y/o (c) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En otros aspectos, el polipéptido comprende (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, o un aminoácido serina (S) en la posición 252, o un aminoácido triptófano (W) en la posición 252 o un aminoácido treonina (T) en la posición 252; y (b) un aminoácido treonina (T) en la posición 254, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos, el polipéptido comprende (a) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y (b) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, o un aminoácido serina (S) en la posición 256, o un aminoácido arginina (R) en la posición 256, o un aminoácido glutamina (Q) en la posición 256, o un aminoácido aspartato (D) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En algunos aspectos, el polipéptido comprende además (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, o un aminoácido serina (S) en la posición 252, o un aminoácido triptófano (W) en la posición 252 o un aminoácido treonina (T) en la posición 252; y (b) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, o un aminoácido serina (S) en la posición 256, o un aminoácido arginina (R) en la posición 256, o un aminoácido glutamina (Q) en la posición 256, o un aminoácido aspartato (D) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En algunos aspectos, el polipéptido comprende además (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, y un aminoácido treonina (T) en la posición 254; o, (b) un aminoácido treonina (T) en la posición 254 y un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256; o, (c) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 y un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos, el polipéptido comprende un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, un aminoácido treonina (T) en la posición 254, y, un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En un aspecto el polipéptido comprende (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; (b) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; (c) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322; (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252; (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y, (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En un aspecto, el polipéptido comprende (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; (b) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; (c) un aminoácido glicina (G) en la posición 331; (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición

- 252; (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y, (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En otro aspecto, el polipéptido comprende (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; (b) un aminoácido alanina (A) en la posición 235; (c) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322; (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252;
- 5 (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y, (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.
- En algunos aspectos, el polipéptido tiene una propiedad farmacocinética (PK) mejorada en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, la propiedad PK es semivida. En ciertos aspectos, el polipéptido ha mejorado la unión de FcRn en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el dominio Fc de IgG no es humano. En otros aspectos, el dominio Fc de IgG es humano. En aspectos específicos, el dominio Fc de IgG no humano es de roedores, burros, ovejas, conejos, cabras, cobayas, camellos, caballos o pollos.
- 10 En algunos aspectos, el dominio Fc de IgG se selecciona del grupo que consiste en dominio Fc de inmunoglobulina G clase 1 (IgG₁) humana, dominio Fc de inmunoglobulina G clase 2 (IgG₂) humana, dominio Fc de inmunoglobulina G clase 3 (IgG₃) humana y dominio Fc de inmunoglobulina G clase 4 (IgG₄) humana. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además un dominio de unión a antígeno. En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno se deriva de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno se deriva de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno comprende (a) un anticuerpo de cadena sencilla; (b) un diacuerpo; (c) una cadena polipeptídica de un anticuerpo; (d) un fragmento F(ab')₂; o, (e) y F(ab) fragmento.
- 15 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una función efectora mediada por Fc reducida en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, la función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En otros aspectos, la función efectora es la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunos aspectos, el polipéptido tiene menor afinidad por un receptor gamma Fc (FcγR) en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el FcγR es un Fcγ humano. En algunos aspectos, el FcγR se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRII y FcγRIII. En algunos aspectos, el FcγRI es FcγRIα. En otros aspectos, el FcγRII es FcγRIIa o FcγRIIb. En otros aspectos más, el FcγRIII es FcγRIII (158V) o FcγRIII (158F).
- 20 En algunos aspectos, el polipéptido se une con afinidad mejorada a FcRn en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el polipéptido tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6.0 que a pH 7.4. En algunos aspectos, el polipéptido se une con afinidad reducida a C1q en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
- 25 En algunos aspectos, el polipéptido muestra un aumento en la estabilidad térmica en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En algunos aspectos, la estabilidad térmica se mide por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En ciertos aspectos, el aumento de la estabilidad térmica es de al menos 4 °C. En algunos aspectos, la estabilidad térmica se mide mediante fluorometría diferencial de barrido (DSF). En aspectos específicos, la sonda fluorescente DSF es Sypro Orange. En algunos aspectos, el aumento en la estabilidad térmica aumenta al menos a 5 °C.
- 30 En algunos aspectos, el polipéptido muestra un aumento en la solubilidad aparente medida con un ensayo de precipitación de polietilenglicol (PEG) en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En algunos aspectos, el polipéptido muestra un aumento en la estabilidad medido usando un ensayo de estabilidad acelerado en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En algunos aspectos, el ensayo de estabilidad acelerada comprende (i) incubación del polipéptido durante un período de tiempo prolongado, y (ii) incubación a alta temperatura. En algunos aspectos, el ensayo de estabilidad acelerada se realiza por incubación a una alta concentración. En algunos aspectos, el período de tiempo prolongado es de al menos un mes. En ciertos aspectos, la alta concentración es de al menos 25 mg/ml. En ciertos aspectos, la temperatura alta es de al menos 40 °C. En algunos aspectos, el ensayo de estabilidad acelerada se realiza mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC) o dispersión de luz dinámica (DLS).
- 35 La presente divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación. También se proporcionan composiciones, vectores de expresión y células huésped que comprenden un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación. La célula huésped puede comprender un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, una composición que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación.
- 40 La presente divulgación también proporciona un método para preparar un polipéptido de la divulgación que comprende (a) cultivo de células huésped que comprenden un ácido nucleico que comprende una secuencia que
- 45
- 50
- 55

codifica el polipéptido de la divulgación; y (b) aislamiento del polipéptido. La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un polipéptido de la divulgación y un portador.

La presente divulgación también proporciona un reactivo de diagnóstico que comprende un polipéptido de la divulgación. En algunos aspectos, el polipéptido está marcado. La presente divulgación también proporciona un conjugado que comprende un polipéptido de la divulgación y una unidad estructural terapéutica. La presente divulgación también proporciona un kit que comprende (a) un polipéptido de la divulgación, (b) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, (c) una composición, vector de expresión o célula huésped que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, (d) una composición que comprende un polipéptido de la divulgación y un portador, (e) un reactivo de diagnóstico que comprende un polipéptido de la divulgación, que en algunos aspectos se puede marcar, o (f) un conjugado que comprende un polipéptido de la divulgación y una unidad estructural terapéutica.

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que necesita tratamiento una cantidad eficaz de (a) un polipéptido de la divulgación, (b) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, (c) una composición, vector de expresión o célula huésped que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la divulgación, (d) una composición que comprende un polipéptido de la divulgación y un portador, (e) un reactivo de diagnóstico que comprende un polipéptido de la divulgación, que en algunos aspectos se puede marcar, o (f) un conjugado que comprende un polipéptido de la divulgación y una unidad estructural terapéutica.

La presente divulgación también proporciona un método para disminuir la función efectora inducida por Fc en un polipéptido original que comprende un dominio Fc que comprende (a) sustitución del aminoácido en la posición 234 en el dominio Fc con fenilalanina (F); (b) sustitución del aminoácido en la posición 235 en el dominio Fc con alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q), o valina (V); y, (c) sustitución del aminoácido en la posición 322 del dominio Fc con alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N), o glutamina (Q); o sustitución del aminoácido en la posición 331 del dominio Fc con alanina (A) o glicina (G), en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos de este método, el dominio Fc del polipéptido original comprende (a) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252, o un aminoácido serina (S) en la posición 252, o un aminoácido triptófano (W) en la posición 252 o un aminoácido treonina (T) en la posición 252; y/o (b) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y/o (c) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256, o un aminoácido serina (S) en la posición 256, o un aminoácido arginina (R) en la posición 256, o un aminoácido glutamina (Q) en la posición 256, o un aminoácido aspartato (D) en la posición 256, en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En otros aspectos de este método, el dominio Fc del polipéptido original comprende (a) una tirosina (Y) en la posición 252; y/o (b) una treonina (T) en la posición 254; y/o, (c) un ácido glutámico (E) en la posición 256; en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

También se proporciona un método para disminuir la función efectora inducida por Fc y aumentar la semivida de un polipéptido original que comprende un dominio Fc, comprendiendo el método (a) sustitución del aminoácido en la posición 234 en el dominio Fc con fenilalanina (F); (b) sustitución del aminoácido en la posición 235 en el dominio Fc con alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q), o valina (V); y, (c) sustitución del aminoácido en la posición 322 del dominio Fc con alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N), o glutamina (Q); o sustitución del aminoácido en la posición 331 del dominio Fc con alanina (A) o glicina (G); y (d) sustitución del aminoácido en la posición 252 con tirosina (Y) o serina (S) o triptófano (W) o treonina (T); en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos del método, el aminoácido en la posición 252 está sustituido con tirosina (Y), en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos de este método, (a) el aminoácido en la posición 254 se puede sustituir con treonina (T); y, (b) el aminoácido en la posición 256 se puede sustituir con ácido glutámico (E) o serina (S), o arginina (R), o glutamina (Q), en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En otros aspectos de este método, el aminoácido en la posición 256 está sustituido con ácido glutámico (E), en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos de este método, el aminoácido en la posición 234 está sustituido con fenilalanina (F); el aminoácido en la posición 235 está sustituido con glutamina (Q); y el aminoácido en la posición 322 está sustituido con glutamina (Q), en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 234 sustituido con fenilalanina (F); el aminoácido en la posición 235 está sustituido con glutamina (Q); y el aminoácido en la posición 331 está sustituido con glicina (G), en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En algunos aspectos de este método, el aminoácido en la posición 234 está sustituido con fenilalanina (F); el aminoácido en la posición 235 está sustituido con alanina (A); y el aminoácido en la posición 322 está sustituido con glutamina (Q), en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. En otros aspectos de este método, la función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunos aspectos de este método, la función efectora la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En otros aspectos de este método, el polipéptido muestra un aumento en la estabilidad térmica en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En algunos aspectos de

este método, la estabilidad térmica se mide por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En algunos aspectos del método, el aumento de la estabilidad térmica es de al menos 4 °C. En ciertos aspectos de este método, la estabilidad térmica se mide por fluorometría diferencial de barrido (DSF) usando una sonda fluorescente DSF. En algunos aspectos de este método, la sonda fluorescente DSF es Sypro Orange. En algunos aspectos de este método, el aumento de la estabilidad térmica es de al menos 5 °C. En otros aspectos de este método, el polipéptido muestra un aumento en la solubilidad aparente medida con un ensayo de precipitación de polietilenglicol (PEG) en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En otros aspectos de este método, el polipéptido muestra un aumento en la estabilidad medido usando un ensayo de estabilidad acelerado en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG FES-YTE. En algunos aspectos de este método, el ensayo de estabilidad acelerada comprende: (i) incubación del polipéptido durante un período de tiempo prolongado, y (ii) incubación a alta temperatura. En algunos aspectos del método, el ensayo de estabilidad acelerada se realiza por incubación a una alta concentración. En algunos aspectos de este método, el período de tiempo prolongado es de al menos un mes. En algunos aspectos de este método, la alta concentración es de al menos 25 mg/ml. En ciertos aspectos de este método, la temperatura alta es de al menos 40 °C.

15 Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 muestra termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc de tipo salvaje (Wt), y de anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc variantes YTE y FES-YTE. Se indican las ubicaciones de los picos de desnaturalización correspondientes a la región Fab del anticuerpo y las regiones CH2 y CH3.

20 La figura 2 muestra termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc variantes FQG-YTE, FQQYTE y FAQ-YTE. Se indican las ubicaciones de los picos de desnaturalización correspondientes a la región Fab del anticuerpo y las regiones CH2 y CH3.

25 La figura 3 muestra ADCC medido en ensayos de citotoxicidad. Las muestras de anticuerpos correspondieron a anticuerpos Ab3 que comprenden dominios Fc de tipo salvaje (WT), y a anticuerpos Ab3 que comprenden dominios Fc variantes FQQ-YTE, FAQ-YTE, YTE o FES-YTE. También se usó un control negativo.

La figura 4 muestra los CDC medidos en ensayos de citotoxicidad. Las muestras de anticuerpos correspondieron a anticuerpos Ab3 que comprenden dominios Fc de tipo salvaje (WT), y a anticuerpos Ab3 que comprenden dominios Fc variantes FQQ-YTE, FQG-YTE, FAQ-YTE, YTE o FES-YTE. También se usó un control negativo.

30 La figura 5 muestra geles de enfoque isoeléctrico (IEF). Las muestras de anticuerpos correspondieron a anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc de tipo salvaje (WT), y a anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc variantes YTE, FES-YTE, FE-YTE, FAQ-YTE, FQG-YTE o FQQ-YTE. También se incluyó un control IgG4.

Descripción detallada

35 La presente divulgación está dirigida a polipéptidos recombinantes que comprenden un dominio Fc variante con sustituciones de aminoácidos que dan como resultado propiedades deseadas, por ejemplo, función efectora reducida y semivida en plasma mejorada, mientras se mantiene la estabilidad, por ejemplo, estabilidad térmica. La presente divulgación se refiere en particular un polipéptidos, más particularmente a inmunoglobulinas, que comprenden un dominio Fc de IgG (por ejemplo, un dominio Fc de IgG humano), o un fragmento del mismo que se une a FcRn (preferiblemente un dominio Fc o bisagra-Fc) que contiene una o más modificaciones de aminoácidos en relación con una IgG de tipo salvaje, y en el que tales modificaciones reducen o eliminan la función efectora.

40 En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere particularmente a la modificación de IgG humanas o humanizadas y otras moléculas bioactivas que contienen porciones de unión a FcRn de dominios Fc de IgG humanas, que tienen un uso particular en terapia, profilaxis y diagnóstico. En algunos aspectos, los polipéptidos comprenden un dominio Fc de IgG, o un fragmento del mismo que se une a FcRn (preferiblemente un dominio Fc o bisagra-Fc) que comprende modificaciones que eliminan la función efectora, así como modificaciones que aumentan la semivida en plasma del polipéptido.

Definiciones

50 Debe notarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una secuencia de polipéptidos" representa una o más secuencias de polipéptidos. Como tal, los términos "un" (o "una"), "una o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en este documento. Además, "y/o" donde se usa en este documento debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. De este modo, el término y/o "como se usa en una frase tal como "A y/o B" en este documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y " B" (solo). Asimismo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en el arte al que se refiere esta divulgación. Por

ejemplo, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; y the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, proporcionan una habilidad con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta divulgación.

5 Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada Système International de Unites (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos, que se pueden tener por referencia a la especificación en su conjunto. De acuerdo con lo anterior, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la especificación en su totalidad.

Se entiende que siempre que se describan aspectos en este documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

15 Los aminoácidos se mencionan en este documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, se conocen por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

20 Como se usa en este documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Como se usa en este documento, el término "proteína" pretende abarcar una molécula compuesta por uno o más polipéptidos, que en algunos casos pueden estar asociados por enlaces distintos de los enlaces amida. Por otro lado, una proteína también puede ser una cadena polipeptídica única. En este último caso, la cadena polipeptídica individual puede comprender en algunos casos dos o más subunidades polipeptídicas fusionadas para formar una proteína. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a los productos de modificaciones posteriores a la expresión, que incluyen, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales ácidos. Un polipéptido o proteína se puede derivar de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no necesariamente se traduce de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluso mediante síntesis química.

30 Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que se han purificado hasta el punto de que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla es sustancialmente puro.

35 Un polipéptido o proteína "recombinante" se refiere a un polipéptido o proteína producido mediante tecnología de ADN recombinante. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para el propósito de la presente divulgación, al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica apropiada.

40 En la presente divulgación también se incluyen fragmentos, variantes o derivados de polipéptidos, y cualquier combinación de los mismos. El término "fragmento" cuando se refiere un polipéptidos y proteínas de la presente descripción incluye cualquier polipéptido o proteína que retenga al menos algunas de las propiedades del polipéptido o proteína de referencia. Los fragmentos de polipéptidos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección.

45 El término "variante" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de polipéptidos que difiere de la de una secuencia de polipéptidos original en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural, esto es, un polipéptido de "tipo salvaje" ("WT"), o puede ser una versión modificada de un polipéptido de tipo salvaje. El término polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí, una composición que comprende el polipéptido o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Preferiblemente, el polipéptido variante (por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante) tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con el polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente seis modificaciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido original. La secuencia polipeptídica variante en este documento tendrá generalmente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos original, y más generalmente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia.

Las variantes de polipéptidos o proteínas de la presente divulgación incluyen fragmentos como se describe anteriormente, y también polipéptidos o proteínas con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales o no naturales. Se pueden producir

variantes no naturales usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras.

El término "derivados", tal como se aplica a los polipéptidos o proteínas, se refiere a los polipéptidos o proteínas que han sido alterados para presentar características adicionales que no se encuentran en el polipéptido o proteína nativa. Un ejemplo de un "derivado" de un dominio Fc variante es una fusión o un conjugado con un segundo polipéptido u otra molécula (por ejemplo, un polímero tal como PEG, un cromóforo o un fluoróforo) o un átomo (por ejemplo, un radioisótopo).

Los términos "polinucleótido" o "nucleótido" como se usan en este documento pretenden abarcar un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales, y se refieren a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plásmido (ADNp). En ciertos aspectos, un polinucleótido comprende un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como el que se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)).

El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Cuando se aplica a un ácido nucleico o polinucleótido, el término "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno nativo, por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido que comprende un dominio Fc variante contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o purificadas (parcial o sustancialmente) de otros polinucleótidos en una solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente divulgación. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente divulgación incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede incluir elementos reguladores tales como promotores, potenciadores, sitios de unión a ribosomas o señales de terminación de la transcripción.

Como se usa en este documento, el término "célula huésped" se refiere a una célula o una población de células que albergan o son capaces de albergar un ácido nucleico recombinante. Las células huésped pueden ser células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o, como alternativa, las células huésped pueden ser eucariotas, por ejemplo, células fúngicas (por ejemplo, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Schizosaccharomyces pombe*), y diversas células animales, tales como células de insectos (por ejemplo, Sf-9) o células de mamíferos (por ejemplo, HEK293F, CHO, COS-7, NIH-3T3).

La presente divulgación también abarca polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante que comprende una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza con otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, la sustitución se considera que es conservadora. En otro aspecto, una cadena de aminoácidos se puede reemplazar de forma conservadora por una cadena estructuralmente similar que difiere en orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se refiere al número de posiciones coincidentes idénticas compartidas por las secuencias en una ventana de comparación, teniendo en cuenta las adiciones o eliminaciones (esto es, brechas) que se deben introducir para una óptima alineación de las dos secuencias. Una posición coincidente es cualquier posición en la que se presenta un nucleótido o aminoácido idéntico tanto en la secuencia diana como en la secuencia de referencia. Las brechas presentadas en la secuencia diana no se cuentan ya que las brechas no son nucleótidos ni aminoácidos. Del mismo modo, las brechas presentadas en la secuencia de referencia no se cuentan ya que se cuentan los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia diana, no los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico o la base de ácido nucleico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias se puede lograr usando software fácilmente disponible tanto para uso en línea como para descarga. Los programas de software apropiados están disponibles de diversas fuentes y para la alineación de secuencias de proteínas y nucleótidos. Un programa apropiado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es *bl2seq*, parte del conjunto de programas BLAST disponible en el sitio web BLAST del U.S. government's National Center for Biotechnology Information BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* realiza una comparación entre dos secuencias

usando ya sea el algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Otros programas apropiados son, por ejemplo, Needle, Stretcher, Water, o Matcher, parte del conjunto de programas de bioinformática EMBOSS y también disponible del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) en www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

5 Las diferentes regiones dentro de una única secuencia diana de polinucleótido o polipéptido que se alinea con una secuencia de referencia de polinucleótido o polipéptido pueden tener cada una su propio porcentaje de identidad de secuencia. Se observa que el valor de identidad de secuencia porcentual se redondea a la décima más cercana. Por ejemplo, 80.11, 80.12, 80.13 y 80.14 se redondean a 80.1, mientras que 80.15, 80.16, 80.17, 80.18 y 80.19 se redondean a 80.2. También se observa que el valor de longitud siempre será un número entero.

10 Un experto en el arte apreciará que la generación de una alineación de secuencia para el cálculo de un porcentaje de identidad de secuencia no se limita a las comparaciones de secuencia de secuencia binaria conducidas exclusivamente por datos de secuencia primaria. Las alineaciones de secuencia se pueden derivar de múltiples alineaciones de secuencia. Un programa apropiado para generar alineamientos de secuencias múltiples es ClustalW2, disponible en www.clustal.org. Otro programa apropiado es MUSCLE, disponible en www.drive5.com/muscle/. ClustalW2 y MUSCLE están disponibles alternativamente, por ejemplo, del EBI.

15 También se apreciará que se pueden generar alineamientos de secuencia integrando datos de secuencia con datos de fuentes heterogéneas tales como datos estructurales (por ejemplo, estructuras de proteínas cristalográficas), datos funcionales (por ejemplo, ubicación de mutaciones) o datos filogenéticos. Un programa apropiado que integra datos heterogéneos para generar una alineación de secuencia múltiple es T-Coffee, disponible en www.tcoffee.org, y alternativamente disponible, por ejemplo, del EBI. También se apreciará que la alineación final usada para calcular el porcentaje de identidad de secuencia se puede curar ya sea de forma automática o manual.

20 El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro del región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de cadena sencilla Fv (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o las subclases de los mismos (isotipos), según la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc. Los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina", como se usan indistintamente en este documento, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas individuales de los mismos.

30 El término "IgG", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están codificados sustancialmente por un gen gamma de inmunoglobulina reconocido. En humanos, esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

35 El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. En la técnica se sabe que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

40 El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos implicados en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto está en contraste con los anticuerpos policlonales que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena única (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos elaborados de varias maneras, que incluyen, pero no se limitan a, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

45 El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un humano hecho usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud

completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende cadena ligera murina y polipéptidos de cadena pesada humana. El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que se ha diseñado para contener secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murina).

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Por lo general, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otro (generalmente humano) para evitar provocar una respuesta inmune en esa especie.

El término "índice de UE como en Kabat" se refiere al sistema de numeración del anticuerpo IgG1 humano de UE descrito en Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Todas las posiciones de aminoácidos a las que se hace referencia en la presente solicitud se refieren a posiciones de índice de UE. Por ejemplo, tanto "L234" como "UE L234" se refieren al aminoácido leucina en la posición 234 de acuerdo con el índice de UE establecido en Kabat.

Los términos "dominio Fc" y "dominio Fc de IgG" como se usan en este documento se refieren a la porción de una inmunoglobulina, por ejemplo, una molécula de IgG, que se correlaciona con un fragmento cristalizante obtenido por digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc comprende la mitad C-terminal de dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están unidas por enlaces disulfuro. No tiene actividad de unión a antígeno, pero contiene la unidad estructural de carbohidrato y los sitios de unión para los receptores de complemento y Fc, incluido el receptor FcRn (véase más abajo). Por ejemplo, un dominio Fc contiene todo el segundo dominio constante CH2 (residuos en las posiciones de UE 231-340 de IgG1, véase, por ejemplo, la Tabla 2) y el tercer dominio constante CH3 (residuos en las posiciones de UE 341-447 de humanos IgG1, véase, por ejemplo, la Tabla 3).

Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fc. Se han observado polimorfismos en una serie de posiciones en dominios Fc, incluidas, pero no limitando a, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356, y 358, de UE, y de este modo, ligeras diferencias entre las secuencias presentadas en la solicitud instantánea y las secuencias conocidas en la técnica puede existir. De este modo, un "dominio Fc de IgG de tipo salvaje" o "dominio Fc de IgG de WT" se refiere a cualquier región Fc de IgG de origen natural (esto es, cualquier alelo). Una sin número de mutantes de Fc, fragmentos de Fc, variantes de Fc y derivados de Fc se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 7,122,637; 7,183,387; 7,332,581; 7,335,742; 7,371,826; 6,821,505; 6,180,377; 7,317,091; 7,355,008; la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2004/0002587; y las Publicaciones Nos. WO 99/058572, WO 2011/069164 y WO 2012/006635.

Las secuencias de las cadenas pesadas de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas se pueden encontrar en una serie de bases de datos de secuencias, por ejemplo, en la base de datos Uniprot (www.uniprot.org) con los números de acceso P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN), y P01861 (IGHG1_HUMAN), respectivamente. Las Tablas 1 a 3 presentan las secuencias de aminoácidos y la numeración de las cadenas pesadas de IgG de IgG1 humana (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3) y IgG4 (SEQ ID NO:4) según el índice de UE establecido en Kabat. Los residuos que difieren entre las subclases de IgG están sombreados y los sitios de variación alélica conocida se indican con un asterisco (*).

TABLA 1. Secuencias de aminoácido y enumeración para las regiones CH1 y visagra (Posiciones UE 118 a 230)

EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E
EU	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
IgG1	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG2	S	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG3	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG4	S	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
EU	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
IgG1	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
IgG2	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
IgG3	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S*	S
IgG4	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
EU	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
IgG1	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T
IgG2	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P*	S	S	N*	F*	G	T	Q	T
IgG3	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S*	L*	G	T	Q	T
IgG4	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T

*sítio de variación alélica conocida

EU	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
IgG1	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K*	V	E	P
IgG2	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R
IgG3	Y	T	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L
IgG4	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S

EU	218		219	220	221	222	223	224	225	226	227	228								
IgG1	K		S	C	D	K	T	H	T	C	P	P								
IgG2	K		C	C	D	V	E	E	C	C	P	P								
IgG3	K	T	P	L	G	D	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	
IgG4	K	Y	G					P	P	C	P	S								

EU																					
IgG1																					
IgG2																					
IgG3	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	
IgG4																					

EU																			229	230
IgG1																			C	P
IgG2																			C	P
IgG3	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P
IgG4																			C	P

*sitio de variación alélica conocida

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos y numeración para la región CH2 (Posiciones UE 231 a 340)

EU	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	
IgG1	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	D	T	L	M
IgG2	A	P	P	V	A	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	D	T	L	M
IgG3	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	D	T	L	M
IgG4	A	P	E	F	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	D	T	L	M
EU	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	
IgG1	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	
IgG2	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	
IgG3	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	
IgG4	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	
EU	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	
IgG1	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	
IgG2	F	N	W	Y	V	D	G	V*	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	
IgG3	F	K	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P*	R*	E	E	Q	Y*	
IgG4	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	
EU	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	
IgG1	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
IgG2	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
IgG3	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L*	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
IgG4	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
EU	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	
IgG1	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	
IgG2	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K	
IgG3	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T*	K	
IgG4	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K	

*sitio de variación alélica conocida

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos y numeración para la región CH3 (Posiciones UE 341 a 447)

EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D*	E	L*	T	K	N	Q
IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N	Q
EU	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384
IgG1	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N
IgG2	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	S*	V	E	W	E	S	N
IgG3	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V*	E	W	E	S	S*
IgG4	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N
EU	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406
IgG1	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG2	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG3	G	Q	P	E	N	N*	Y	N	T	T	P	P	M*	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG4	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L
EU	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428
IgG1	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG2	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG3	Y	S	K*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q*	G	N	I*	F	S	C	S	V	M
IgG4	Y	S	R*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S	C	S	V	M
EU	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447			
IgG1	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG2	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG3	H	E	A	L	H	N	R*	F*	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG4	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L	G	K			

*sitio de variación alélica conocida

Los términos "dominio Fc de IgG variante" y "dominio Fc de IgG variante" como se usan en este documento se refieren a un dominio Fc de IgG que comprende una o más sustituciones, delecciones, inserciones o modificaciones

de aminoácidos introducidas en cualquier posición dentro del dominio Fc. En ciertos aspectos, un dominio Fc de IgG variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una afinidad de unión disminuida o eliminada por un FcγR y/o C1q en comparación con el dominio Fc de tipo salvaje que no comprende la una o más sustituciones de aminoácidos. Las interacciones de unión a Fc son esenciales para una variedad de funciones efectoras y eventos de señalización posteriores que incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De acuerdo con lo anterior, en ciertos aspectos, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un anticuerpo, proteína de fusión o conjugado) puede presentar una afinidad de unión alterada durante al menos uno o más ligandos de Fc (por ejemplo, FcγR) en relación con un polipéptido correspondiente que tiene la misma secuencia de aminoácidos pero que no comprende la una o más sustitución, delección, inserción o modificación de uno o más aminoácidos, tal como, por ejemplo, una región Fc no modificada que contiene residuos de aminoácidos naturales en la posición correspondiente en la región Fc.

Los términos "YTE" o "mutante YTE" se refieren a un conjunto de mutaciones en un dominio Fc de IgG1 que da como resultado un aumento en la unión al FcRn humano y mejora la semivida en suero del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante YTE comprende una combinación de tres "mutaciones YTE": M252Y, S254T y T256E, en el que la numeración está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat, introducida en la cadena pesada de una IgG. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 7,658,921, que se incorpora en este documento como referencia. Se ha demostrado que el mutante YTE aumenta la semivida en suero de los anticuerpos en comparación con las versiones de tipo salvaje del mismo anticuerpo. Véase, por ejemplo, Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006) y la Patente de los Estados Unidos No. 7,083,784, que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. Un mutante "Y" comprende solo las mutaciones M256Y de manera similar, una mutación "YT" comprende solo la M252Y y S254T y una mutación "YE" comprende solo la M252Y y T256E. Se contempla específicamente que otras mutaciones pueden estar presentes en las posiciones 252 y/o 256 de UE. En ciertos aspectos, la mutación en la posición 252 de UE puede ser M252F, M252S, M252W o M252T y/o la mutación en la posición 256 de UE puede ser T256S, T256R, T256Q o T256D.

Los términos "FES" o "FES mutante" se refieren a un conjunto de mutaciones en un dominio Fc de IgG que dan como resultado la ablación de la función efectora, es decir, la eliminación de la capacidad del dominio Fc para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad mediada por complemento. En ciertos aspectos, un mutante FES puede comprender una combinación de tres "mutaciones FES": L234F, L235E y P331S, donde la numeración está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. Estas mutaciones causan una disminución profunda de la unión del dominio Fc al FcγRI humano (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIII (CD16) y C1q. Véase, por ejemplo, el documento US 2011/0059078 y Oganessian et al. Acta Crystallographica D 64:700-704 (2008), que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. Un mutante "FE" comprende solo las mutaciones L234F y L235E.

El término "dominio Fc de IgG FES-YTE" se refiere a un dominio Fc de tipo salvaje de IgG que comprende las tres mutaciones "FES" (L234F/L235E/P331S) y las tres mutaciones "YTE" (M252Y/S254T/T256E), donde toda la numeración está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. Como se demuestra en este documento, cuando se combinan las mutaciones FES e YTE (por ejemplo, en un dominio Fc "FES-YTE"), hay una reducción considerable en la estabilidad de la proteína en comparación con el polipéptido correspondiente sin dicho conjunto de mutaciones (véase el Ejemplo 1 a continuación)

El término "fusión Fc", como se usa en este documento, se refiere a una proteína en la que uno o más polipéptidos o moléculas pequeñas están operativamente unidos a un dominio Fc o una variante o derivado del mismo. Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con un socio de fusión, que en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de una fusión Fc, esto es, el socio de fusión, puede ser mediar la unión al objetivo, y de este modo puede ser funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo.

El término polipéptido "original" tal como se usa en este documento se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un dominio Fc original, o un polipéptido que comprende un dominio Fc tal como anticuerpo o fusión Fc) que se modifica posteriormente para generar una variante (por ejemplo, un dominio Fc variante, o un polipéptido variante que comprende un dominio Fc tal como un anticuerpo variante o una fusión Fc variante). El polipéptido original puede ser un polipéptido natural (por ejemplo, un dominio Fc de tipo salvaje), o una versión variada o modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural (por ejemplo, un dominio Fc YTE y/o un dominio Fc FES-YTE). El término polipéptido original puede referirse al propio polipéptido, composiciones que comprenden el polipéptido original o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. De acuerdo con lo anterior, por "dominio Fc original" como se usa en este documento se entiende un dominio Fc que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo original" como se usa en este documento se entiende un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante que comprende un dominio Fc de IgG variante.

El término "polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG" como se usa en este documento se refiere a un polipéptido que comprende un dominio variante Fc de IgG como se definió anteriormente.

Una "variante Fc" comprende un dominio Fc y puede existir solo o en el contexto de un anticuerpo, fusión Fc, Fc aislado, fragmento Fc u otro polipéptido. Las variantes de Fc pueden referirse al propio polipéptido de Fc, composiciones que comprenden el polipéptido variante de Fc o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Los dominios variantes Fc de IgG descritos en este documento se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que los componen. Para todas las posiciones de aminoácidos discutidas en este documento, la numeración siempre está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat. De este modo, por ejemplo, M252Y es una variante Fc con la metionina (M) en la posición 252 de UE sustituida con tirosina (Y) en relación con el dominio Fc original. Del mismo modo, por ejemplo, M252Y/S254T/T256E define una variante Fc variante con sustituciones en las posiciones 252 (M a Y), 254 (S a T) y 256 (T a E) de UE en relación con el dominio Fc original. También se puede designar una variante de acuerdo con su composición final de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de UE mutados. Por ejemplo, el mutante M252Y/S254T/T256E puede denominarse YTE. Se observa que el orden en que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, por ejemplo, M252Y/S254T/T256E es la misma variante Fc que T256E/S254T/M252Y.

Los términos "receptor gamma Fc" o "FcγR" como se usan en este documento se refieren a cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y están codificados por los genes FcγR. En los seres humanos, esta familia incluye, pero no se limitan a, FcγRI (CD64), incluidas las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluidas las isoformas FcγRIIa (incluidos los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluidos FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluidas las isoformas FcγRIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluidos los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), así como cualquier FcγR humano no descubierto o isoformas o alotipos FcγR. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluidos, pero no se limitan a, 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 o isoformas o alotipos de FcγR de ratón no descubierto.

El término "FcRn" o "receptor de FcRn", como se usa en este documento, se refiere a un receptor de Fc ("n" indica neonatal) que se sabe que está implicado en la transferencia de IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primates, o saco vitelino (conejos) y a un recién nacido desde el calostro a través del intestino delgado. También se sabe que FcRn participa en el mantenimiento de niveles constantes de IgG en suero al unir las moléculas de IgG y reciclarlas en el suero. La unión de FcRn a las moléculas de IgG depende del pH con una unión óptima a pH 6.0 y una unión débil a pH > 7.0. Mientras que la unión de las IgG a los receptores FcγR puede desencadenar la función efectora (por ejemplo, ADCC), la unión a FcRn de manera dependiente del pH puede prolongar la semivida de los anticuerpos de IgG en el suero. La función efectora puede ser indeseable para una molécula con una semivida prolongada en suero.

El término "función efectora" como se usa en este documento se refiere a un evento bioquímico que resulta de la interacción de un dominio Fc con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, ADCC, ADCP y CDC. Por "célula efectora", como se usa en este documento, se entiende una célula del sistema inmune que expresa o uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células γδT, y puede ser de cualquier organismo incluido, pero no limitado a humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Los términos "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en la que un polipéptido que comprende un dominio Fc, por ejemplo, un anticuerpo, unido a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, principalmente células NK, neutrófilos y macrófagos) y permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una "célula diana" portadora de antígeno y posteriormente maten la célula diana con citotoxinas. (Hogarth et al., Nature review Drug Discovery 2012, 11:313) Se contempla que, además de los anticuerpos y fragmentos de los mismos, otros polipéptidos que comprenden dominios Fc, por ejemplo, proteínas de fusión Fc y proteínas conjugadas Fc, que tienen la capacidad de unirse específicamente a una célula diana portadora de antígeno podrá efectuar citotoxicidad mediada por células.

Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por células resultante de la actividad de un polipéptido que comprende un dominio Fc también se denomina en este documento actividad ADCC. Se puede analizar la capacidad de cualquier polipéptido particular de la presente divulgación para mediar la lisis de la célula diana por ADCC. Para evaluar la actividad de ADCC, se agrega un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) a las células diana en combinación con las células efectoras inmunes, lo que resulta en la citólisis de la célula diana. La citólisis generalmente se detecta mediante la liberación del marcador (por ejemplo, sustratos radiactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Ejemplos específicos de ensayos *in vitro* de ADCC se describen en Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351 (1987); Wilkinson et al., J. Immunol. Methods 258:183 (2001); Patel et al., J. Immunol. Methods 184:29 (1995). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC del anticuerpo de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el descrito en Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652 (1998).

El término "CDC", como se usa en este documento, se refiere a citotoxicidad dependiente del complemento, esto es, un evento bioquímico de destrucción celular dirigida mediada por el sistema del complemento.

Los términos "semivida" o "semivida *in vivo*" como se usan en este documento se refieren a la semivida biológica de un tipo particular de polipéptido de la presente divulgación en la circulación de un animal dado y está representado por un tiempo requerido para que la mitad de la cantidad administrada en el animal se elimine de la circulación y/u otros tejidos en el animal.

El término "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero no se limita a humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un particular tratamiento. Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento en referencia a un sujeto humano.

El término "composición farmacéutica" como se usa en este documento se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual se administraría la composición. Dicha composición puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, como se describe en este documento, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito establecido. El término "cantidad eficaz terapéuticamente" como se usa en este documento se refiere a una cantidad de un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

El término "marcador" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente a un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, para generar un polipéptido "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Los términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" se refieren a ambas (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una condición o trastorno patológico diagnosticado y (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una condición o trastorno patológico específico. De este modo, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno.

El término "vector" significa una construcción, que es capaz de entregar, y en algunos aspectos, expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como las células productoras.

Dominios Fc de IgG variantes

En algunos aspectos, se proporcionan dominios variantes Fc de IgG que comprenden mutaciones que confieren una semivida en suero prolongada y disminuyen en gran medida o eliminan por completo la función efectora. Estos dominios variantes Fc de IgG se pueden introducir, por ejemplo, en anticuerpos terapéuticos existentes para alterar favorablemente los parámetros farmacocinéticos (así como para permitir una dosificación menos frecuente) al tiempo que disminuyen las actividades adversas no deseadas de ADCC y CDC.

El conjunto de mutaciones YTE (correspondiente a las sustituciones UE M252Y, UE S254T y UE T256E) (Dall'Acqua et al., J. Immunol. 169:5171-80 2002; Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)) ubicado en la región CH2 del dominio Fc se ha demostrado que mejora la semivida en suero del anticuerpo en monos cinomolgos al mejorar la unión al receptor de reciclaje FcRn a pH 6. La mutación triple FES (correspondiente al conjunto de sustituciones UE L234F, UE L235E y UE P331S) también localizadas en la región CH2 del dominio Fc puede anular la unión de FCγR y C1q resultando en un anticuerpo incapaz de provocar ADCC o CDC (Oganesyan et al., Acta Crystallogr. D 64:700-704 (2008)). Como se demuestra en este documento, la combinación de estas mutaciones en un dominio Fc variante, por ejemplo, un dominio Fc variante en un anticuerpo da como resultado un dominio Fc que tiene una estabilidad térmica reducida en comparación con una molécula original de tipo salvaje, por ejemplo, un Fc de IgG1 de tipo salvaje.

Como se demuestra en este documento, las sustituciones de aminoácidos del dominio Fc de IgG específicas en las posiciones 234, 235 y 322 o 331 de UE (por ejemplo, L234F/L235Q/K322Q o L234F/L235Q/P331G) reducen o eliminan en gran medida ADCC y CDC. Cuando estas sustituciones específicas de aminoácidos del dominio Fc de IgG en las posiciones 234, 235 y 322 o 331 de UE se combinan con mutaciones YTE, los dominios Fc variantes de Ig resultantes muestran propiedades ADCC y CDC equivalentes a las de los mutantes FES-YTE pero también se muestran en gran medida características mejoradas de estabilidad térmica.

De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, una variante de un dominio IgG humano o un fragmento de unión a FcRn del mismo) que comprende:

(i) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234 de UE,

5 (ii) un aminoácido alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q) o valina (V) en la posición 235 de UE, y

(iii) un aminoácido alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N) o glutamina (Q) en la posición 322 de UE, o, como alternativa, un aminoácido alanina (A) o glicina (G) en la posición 331 de UE.

10 En un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235 de UE y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322 de UE. En lo que sigue, este dominio Fc de IgG variante y el conjunto de sustituciones de aminoácidos se denominará "FQQ".

15 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante, que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235 de UE y un aminoácido glicina (G) en la posición 331 de UE. En lo que sigue, este dominio Fc de IgG variante y el conjunto de sustituciones de aminoácidos se denominarán "FQG".

En otro aspecto más, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante, que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, un aminoácido alanina (A) en la posición 235 de UE y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322 de UE. En lo que sigue, este dominio Fc de IgG variante y el conjunto de sustituciones de aminoácidos se denominarán "FAQ".

20 En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante, que comprende tres de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en las posiciones 234, 235 y 322 o 331 de UE, y además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una cualquiera de las posiciones 252, 254 o 256 de UE. De este modo, en un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE, o un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 252 de UE, o un aminoácido serina (S) en la posición 252 de UE, o un aminoácido triptófano (W) en la posición 252 de UE o un aminoácido treonina (T) en la posición 252 de UE. En un aspecto particular, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE.

30 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE, o un aminoácido serina (S) en la posición 256 de UE, o un aminoácido arginina (R) en la posición 256 de UE, o un aminoácido glutamina (Q) en la posición 256 de UE, o un aminoácido aspartato (D) en la posición 256 de UE. En un aspecto particular, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

40 En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende tres de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en las posiciones 234, 235 y 322 o 331 de UE, y además comprende sustituciones en dos posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE y un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE.

45 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE. En otro aspecto más, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ) que comprende además un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

50 En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante con tres de los aminoácidos descritos anteriormente en las posiciones 234, 235 y 322 o 331 de UE (por ejemplo, un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ), en el que el dominio Fc de IgG variante comprende además un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE, un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE, y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235 de UE, un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322 de UE, un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE, un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

- 5 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, un aminoácido de glutamina amino (Q) en la posición 235 de UE, un aminoácido de glicina (G) en la posición 331 de UE, un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE, un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE. En otro aspecto más, un polipéptido es provisto que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, una alanina (A) en la posición 235 de UE, un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322 de UE, un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252 de UE, un aminoácido treonina (T) en la posición 254 de UE, y un aminoácido ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE. De este modo, la presente divulgación abarca, pero no se limita a, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante con mutaciones FQQ e YTE, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante con mutaciones FQG e YTE y un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante con mutaciones FAQ y YTE.
- 10
- 15

En algunos aspectos, el polipéptido original del dominio Fc de IgG variante ya contiene uno o más de los aminoácidos correspondientes a las sustituciones discutidas anteriormente, por ejemplo, el polipéptido Fc original puede contener una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE como se encuentra en IgG4. En tales aspectos, no se requiere ninguna modificación del aminoácido o aminoácidos que ya contienen una o más de las sustituciones descritas.

20

En algunos aspectos, el dominio Fc de IgG variante es humano. En algunos otros aspectos, el dominio Fc de IgG variante no es humano. Los dominios Fc de IgG no humanos pueden ser, por ejemplo, de roedores (por ejemplo, ratas o ratones), burro, oveja, conejo, cabra, cobayas, camello, caballo o pollo. Un dominio Fc de IgG variante humano puede ser, por ejemplo, un dominio Fc de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Cuando el dominio Fc de IgG variante es un dominio Fc de IgG de ratón, el dominio puede ser, por ejemplo, un dominio de subclase IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3.

25

En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 32. En algunos otros aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 32. En base a las enseñanzas proporcionadas en este documento, un experto en el arte entenderá que los dominios variantes Fc de IgG proporcionados en SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 32 representan una variación alélica particular. De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende una variación alélica diferente de un dominio Fc de IgG variante como se proporciona en la SEQ ID NO: 9 a la SEQ ID NO: 32. Los sitios de variación alélica conocidos se proporcionan en las tablas 1-3.

30

35

En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una de las secuencias de aminoácidos descritas en la tabla 4 (SEQ ID NO: 37 a SEQ ID NO: 40). En otros aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante que consiste en una de las secuencias de aminoácidos descritas en la tabla 4 (SEQ ID NO: 37 a SEQ ID NO: 40). En base a las enseñanzas proporcionadas en este documento, un experto en el arte entenderá que los dominios variantes Fc de IgG proporcionados en SEQ ID NO: 37 a SEQ ID NO: 40 representan una variación alélica particular. De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende una variación alélica diferente de un dominio Fc de IgG variante como se proporciona en la SEQ ID NO: 37 a la SEQ ID NO: 40. Los sitios de variación alélica conocida se proporcionan en las tablas 1-3.

40

TABLA 4. Dominios Fc de IgG variantes.

Sitio*	Posición de la UE	Aminoácidos Nativos				Sustitución de aminoácidos
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
X ₁	234	L	V	L	F	F
X ₂	235	L	A	L	L	A,N,F,Q,V
X ₃	322	K	K	K	K	A,D,E,H,N,Q
X ₄	331	P	P		S	A,G
X ₅	252	M	M	M	M	Y
X ₆	254	S	S	S	S	T
X ₇	256	T	T	T	T	E
Dominios Fc de IgG1 variantes (SEQ ID NO: 37)						
PAPE[X ₁ X ₂]GGPSVFLFPPKPKDITL[X ₃][X ₄ R][X ₅ R][X ₆ R][X ₇]PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[X ₃]VSNKALPAX ₄]IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK						
Dominios Fc de IgG2 variantes (SEQ ID NO: 38)						
PAPP[X ₁ X ₂]GPSVFLFPPKPKDITL[X ₃][X ₄ R][X ₅ R][X ₆ R][X ₇]PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK[X ₃]VSNKGLPAX ₄]IEKTI KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQPENNYKT TTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK						
Dominios Fc de IgG3 variantes (SEQ ID NO: 39)						
PAPE[X ₁ X ₂]GGPSVFLFPPKPKDITL[X ₃][X ₄ R][X ₅ R][X ₆ R][X ₇]PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[X ₃]VSNKALPAX ₄]IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYN TTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK						
Dominios Fc de IgG3 variantes (SEQ ID NO: 40)						

(continuación)

Sitio*	Posición de la UE	Aminoácidos Nativos				Sustitución de aminoácidos
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
		PAPE[X ₁ X ₂ GGPSVFLFPPKPKDTL[X ₃ [X ₄ R[X ₅ PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK[X ₃ VSNKGLPS[X ₄ IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGK				

* Los aminoácidos en los sitios 1 a 7 en las secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (posiciones en cajas) pueden ser cualquier sustitución de aminoácidos o aminoácidos nativos.

Semivida aumentada

5 En algunos aspectos, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante como se describe anteriormente tiene una propiedad farmacocinética (PK) mejorada en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. Ejemplos de tales propiedades PK mejoradas son, por ejemplo, unión mejorada a un receptor FcRn, o aumento de la semivida. Un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante como se proporciona en este documento puede tener una semivida (por ejemplo, semivida en suero) en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) mayor de 5 días, mayor de 10 días, mayor de 15 días, mayor de 20 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses o mayor de 5 meses .

10 La semivida aumentada de un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG proporcionado en este documento en un mamífero da como resultado un título de suero más elevado del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo), y de este modo, puede reducir la frecuencia de la administración del polipéptido y/o reducir la concentración de polipéptido que se va a administrar.

15 En aspectos específicos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que comprende sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), exhibe un aumento en la semivida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que comprende sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), además comprende mutaciones FQQ, FQG o FAQ, y puede presentar un aumento en la semivida, así como una función efectora de Fc reducida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.

20 En aspectos específicos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que comprende sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE) tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6.0 que a pH 7.4 en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, un dominio variante Fc de IgG que comprende sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, las mutaciones Y, YT, YE, YTE comprenden además mutaciones FQQ, FQG o FAQ, y puede presentar una mayor afinidad por FcRn a pH 6.0 que a pH 7.4 y una función efectora de Fc reducida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.

Enlace a los receptores Fc

30 Un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos del mismo que comprende un dominio Fc de IgG variante), puede comprender además la sustitución de al menos un residuo de aminoácido ubicado en la región Fc, donde dicha sustitución da como resultado en afinidad reducida o ablacionada por al menos un ligando Fc. Como se describió anteriormente, un dominio Fc de tipo salvaje interactúa con una serie de ligandos que incluyen, pero no se limitan a, los receptores FcγR (por ejemplo, FcγRIIb, FcγRIIIa) y la proteína del complemento C1q, y estas interacciones son esenciales para una variedad de funciones efectoras y eventos de señalización aguas abajo que incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). De acuerdo con lo anterior, en ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante que tiene afinidad reducida o eliminada por un ligando Fc responsable de facilitar la función efectora en comparación con una molécula que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula descrita pero que no comprende la sustitución de al menos un residuo de aminoácido a la región Fc.

45 En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG, que comprende una o más de las siguientes propiedades: función efectora reducida o ablacionada (ADCC y/o CDC), unión reducida o ablacionada a receptores Fc, o citotoxicidad reducida o ablacionada. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad reducida por los receptores FcγR (por ejemplo, FcγRIIb, FcγRIIIa) y/o la proteína del complemento C1q. En algunos aspectos, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG tiene una mayor unión a los receptores FcRn.

50 Un experto en el arte comprenderá que un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG puede tener propiedades de unión a FcγR y/o C1q alteradas (en relación con una molécula no modificada). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación de equilibrio (K_D), tasas de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente), afinidad de unión y/o avidez. En la técnica se sabe que la constante de disociación de equilibrio (K_D) se define como k_{off}/k_{on} .

55 Un experto en el arte puede determinar qué parámetro cinético es más importante para una aplicación terapéutica o de diagnóstico dada. Por ejemplo, una modificación que reduzca la unión a uno o más reguladores positivos (por ejemplo, FcγRIIIA) y/o una unión mejorada a un receptor Fc inhibitor (por ejemplo, FcγRIIB) sería apropiada para reducir la actividad de ADCC. De acuerdo con lo anterior, la proporción de afinidades de unión (por ejemplo, K_D) puede indicar si la actividad ADCC de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG aumenta o disminuye. Además, una modificación que reduce la unión a C1q sería apropiada para reducir o eliminar la actividad de CDC.

- Las afinidades y propiedades de unión de un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante para su ligando, se pueden determinar mediante una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, esto es, unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye dichos métodos incluyen métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (por ejemplo, resonancia de plasma de superficie, tales como el análisis BIACORE®), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel).
- Estos y otros métodos pueden usar una etiqueta en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplean una variedad de métodos de detección que incluyen pero no se limitan a etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Se puede encontrar una descripción detallada de las afinidades de unión y la cinética en Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999).
- En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad de unión reducida para uno o más receptores Fc que incluyen, pero no se limitan a FcγRI (incluidas las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc); FcγRII (incluidas las isoformas FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIc); y FcγRIII (incluidas las isoformas FcγRIIIa y FcγRIIIb) en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, la unión de un polipéptido que contiene el dominio Fc de IgG variante a uno o más receptores Fc como se indicó anteriormente se ablaconan completamente.
- En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad disminuida a FcγRI con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRI que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje o se reduce a un nivel indetectable.
- En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRI que es al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50 %, al menos 40%, al menos 30%, al menos 20%, al menos 10% o al menos 5% menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el FcγRI es la isoforma FcγRIa. En otros aspectos, el FcγRI es la isoforma FcγRIb. En otro aspecto más, el FcγRI es la isoforma FcγRIc.
- En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad disminuida a FcγRII con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRII que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
- En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRII que es al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50 %, al menos 40%, al menos 30%, al menos 20%, al menos 10% o al menos 5% menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el FcγRII es la isoforma FcγRIIa. En otro aspecto, la isoforma FcγRIIa es el alotipo H131. En otro aspecto más, la isoforma FcγRIIa es el alotipo R131. En otros aspectos, el FcγRII es la isoforma FcγRIIb. En algunos aspectos, la isoforma FcγRIIb es FcγRIIb-1. En otros aspectos, la isoforma FcγRIIb es FcγRIIb-2. En otro aspecto más, el FcγRII es la isoforma FcγRIIc.
- En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad disminuida a FcγRIII con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRIII que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
- En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por el receptor FcγRIII que es al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50 %, al menos 40%, al menos 30%, al menos 20%, al menos 10% o al menos 5% menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, el FcγRIII es la isoforma FcγRIIIa. En otros aspectos, el FcγRIIIa es alotipo 158V (variante alélica F158V). En otros aspectos, el FcγRIIIa es el alotipo 158F. En otros aspectos, el FcγRIII es la isoforma FcγRIIIb. En otro aspecto, el FcγRIIIb es el alotipo NA1. En otros aspectos, el FcγRIIIb es el alotipo NA2.

Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG proporcionado en este documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos del mismo que comprende un dominio Fc de IgG variante), puede comprender además la sustitución de al menos un residuo de aminoácido ubicado en la región Fc, donde dicha sustitución da como resultado en mayor afinidad por FcRn. Como se describió anteriormente, la interacción dependiente del pH de un dominio Fc de tipo salvaje con FcRn prolonga la semivida. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad aumentada a FcRn con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por los receptores FcRn que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces más que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por los receptores FcRn que es al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 40 %, al menos 30%, al menos 20%, al menos 10% o al menos 5% más que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje. En aspectos particulares, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una mayor afinidad por FcRn a pH 6.0 que a pH 7.4.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por los receptores FcγR que está entre 100 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μM, o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μM, o aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por los receptores FcγR que es más que 1 μM, más que 5 μM, más que 10 μM, más que 25 μM, más que 50 μM, o más que 100 μM. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por los receptores FcγR que es menos que 100 μM, menos que 50 μM, menos que 10 μM, menos que 5 μM, menos que 2.5 μM, menos que 1 μM, o menos que 100 nM, o menos que 10 nM.

En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta una afinidad disminuida a FcγR en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE) que presenta una afinidad disminuida a FcγR en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta una unión completamente ablacionada a FcγR en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una unión completamente ablacionada a FcγR en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta una afinidad aumentada a FcRn en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una afinidad aumentada a FcRn en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.

Enlace a C1q

La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula, por ejemplo, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, en complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996), se pueden realizar.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad disminuida a C1q con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta afinidades para el receptor C1q que son al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces,

o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

5 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por Clq que es al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 40%, al menos 30%, al menos 20%, al menos 10%, o al menos 5% menos que un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

10 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por Clq que está entre aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μM, o aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μM, o aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM, o aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una afinidad por Clq que es más que 1 μM, más que 5 μM, más que 10 μM, más que 25 μM, más que 50 μM, o más que 100 μM.

15 En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ, que presenta una afinidad disminuida a Clq en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una afinidad disminuida a Clq en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

20

25 En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta una unión completamente ablacionada a Clq en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una unión completamente ablacionada a Clq en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

Actividad ADCC reducida

30 En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una actividad ADCC disminuida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una actividad de ADCC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces menos que la de un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje, o no tiene actividad ADCC detectable a una concentración de 300 μg/ml. En otro aspecto más,

35 se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una actividad de ADCC que se reduce en al menos 10%, o al menos 20%, o en al menos 30%, o en al menos 40%, o en al menos 50%, o en al menos 60%, o en al menos 70%, o en al menos 80%, o en al menos 90%, o en al menos 100%, o en al menos 200%, o en al menos 300%, o en al menos 400%, o en al menos 500% con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que no tiene actividad ADCC detectable.

40

En aspectos específicos, la reducción o ablación de la actividad ADCC se puede atribuir a la afinidad reducida que un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG proporcionado en este documento se presenta para ligandos y/o receptores Fc.

45 En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta reducción o ablación de la actividad ADCC en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una reducción o ablación de la actividad ADCC en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

50

Se contempla que un polipéptido que contiene un dominio variante de IgG proporcionado en este documento se puede caracterizar por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que tiene propiedades de unión y funciones celulares efectoras similares en modelos *in vivo* que aquellos en ensayos basados en *in vitro*. Sin embargo, la presente divulgación no excluye un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que no presenta el fenotipo deseado en ensayos basados *in vitro* pero presenta el fenotipo deseado *in vivo*.

55

Actividad de CDC reducida

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una actividad de CDC disminuida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que presenta actividad de CDC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces menos que la de un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto más, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que presenta actividad de CDC que se reduce en al menos 10%, o al menos 20%, o en al menos 30%, o en al menos 40%, o en al menos 50%, o en al menos 60%, o en al menos 70%, o en al menos 80%, o en al menos 90%, o en al menos 100%, o en al menos 200%, o en al menos 300%, o en al menos 400%, o en al menos 500% con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje, o no tiene actividad de CDC detectable a una concentración de 300 µg/ml. En ciertos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG que no muestra actividad de CDC detectable. En aspectos específicos, la reducción y/o ablación de la actividad de CDC puede atribuirse a la afinidad reducida que presenta un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante para los ligandos y/o receptores Fc.

En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que presenta una actividad de CDC disminuida o completamente ablacionada en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que muestra una actividad de CDC disminuida o completamente ablacionada en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

Toxicidad reducida

Si bien las funciones efectoras (por ejemplo, ADCC y CDC) pueden ser un mecanismo importante que contribuye a la eficacia clínica, se entiende en la técnica que las terapias biológicas pueden tener problemas de toxicidad adversos asociados con la naturaleza compleja de dirigir el sistema inmune para reconocer y atacar células y/u objetivos no deseados. Adicionalmente, cuando el reconocimiento y/o el objetivo del ataque no tienen lugar donde se requiere el tratamiento, pueden ocurrir consecuencias tales como toxicidad adversa. De este modo, dependiendo del mecanismo de acción deseado, las funciones efectoras de una molécula terapéutica dada se pueden modular para reducir las toxicidades relacionadas.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una toxicidad reducida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una toxicidad que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menos que la de un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una toxicidad que se reduce en al menos 10%, o al menos 20%, o en al menos 30%, o en al menos 40%, o en al menos 50%, o en al menos 60%, o en al menos 70%, o en al menos 80%, o en al menos 90%, o en al menos 100%, o en al menos 200%, o en al menos 300%, o en al menos 400%, o en al menos 500% con respecto a un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ, que presenta toxicidad reducida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje. En otros aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una toxicidad reducida en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG de tipo salvaje.

Estabilidad aumentada

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que posee una mayor estabilidad, por ejemplo, estabilidad térmica, en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que posee una mayor estabilidad, por ejemplo, estabilidad térmica, en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además mutaciones YTE, que posee

una mayor estabilidad, por ejemplo, estabilidad térmica, en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

5 Como se usa en este documento, el término "estabilidad" se refiere a una medida reconocida en la técnica del mantenimiento de una o más propiedades físicas de un polipéptido en respuesta a una condición ambiental (por ejemplo, una temperatura elevada o baja). En ciertos aspectos, la propiedad física puede ser el mantenimiento de la estructura covalente del polipéptido (por ejemplo, la ausencia de escisión proteolítica, oxidación o desamidación no deseada). En otros aspectos, la propiedad física también puede ser la presencia del polipéptido en un estado plegado adecuadamente (por ejemplo, la ausencia de agregados o precipitados solubles o insolubles). En un aspecto, la estabilidad del polipéptido se mide analizando una propiedad biofísica del polipéptido, por ejemplo, 10 estabilidad térmica, perfil de despliegue de pH, eliminación estable de glucosilación, solubilidad, función bioquímica (por ejemplo, capacidad para unirse a otra proteína), % de fragmentación, pérdida de pureza, etc., y/o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, la función bioquímica se demuestra por la afinidad de unión de la interacción.

15 En un aspecto, una medida de la estabilidad de la proteína es la estabilidad térmica, esto es, la resistencia al desafío térmico. La estabilidad se puede medir usando métodos conocidos en la técnica, tales como HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), SEC (cromatografía de exclusión de tamaño), DLS (dispersión dinámica de luz), etc. Los métodos para medir la estabilidad térmica incluyen, pero no se limitan a calorimetría diferencial de barrido (DSC), fluorometría diferencial de barrido (DSF), difracción circular (CD) y ensayo de desafío térmico.

20 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una estabilidad térmica incrementada en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE, medido por DSC. En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSC de al menos 1 °C, al menos 2 °C, al menos 3 °C, al menos 4 °C, al menos 5 °C, al menos 6 °C, al menos 7 °C, al menos 8 °C, al menos 9 °C o al menos 10 °C en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En otros aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSC de aproximadamente 1 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 9 °C o aproximadamente 10 °C en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

30 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que muestra un aumento en la estabilidad térmica medida por DSC en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además mutaciones YTE, que presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSC en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

40 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una estabilidad térmica aumentada en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE, medida por DSF. En algunos aspectos, la estabilidad térmica se mide usando DSF y la sonda fluorescente SYPRO® Orange DSF. Un experto en el arte entenderá que las sondas fluorescentes que no sean SYPRO® Orange, tales como Nile Red, SYPRO® Red, ácido dapoxil sulfónico, ácido bis-anilino-naftalenosulfónico (bis-ANS), ácido 1-anilino-naftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS), o CPM entre otras, se pueden usar para medir la estabilidad de la proteína mediante DSF (véase, por ejemplo, Niesen et al., Nature Protocols 2:2212-21 (2007)).

45 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSF usando SYPRO® Orange de al menos 1 °C, al menos 2 °C, al menos 3 °C, al menos 4 °C, al menos 5 °C, al menos 6 °C, al menos 7 °C, al menos 8 °C, al menos 9 °C o al menos 10 °C en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En otros aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSF usando SYPRO® Orange de aproximadamente 1 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 9 °C o aproximadamente 10 °C en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

55 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta un aumento en la estabilidad térmica según lo medido por DSF usando SYPRO® Orange en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además mutaciones YTE, que

presenta un aumento en la estabilidad térmica medida por DSF usando SYPRO® Orange en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

5 En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta una solubilidad aparente aumentada en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG FES-YTE, medida usando un ensayo de precipitación de polietilenglicol (PEG). Véase, por ejemplo, Middaugh et al., J. Biol. Chem. 254:367-370 (1979); Shire et al., eds., 2010, Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, Springer; Gibson et al., J. Pharm. Sci. 100:1009-21 (2011). En algunos aspectos, un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta una solubilidad aparente aumentada medida mediante el uso de un ensayo de precipitación de polietilenglicol (PEG) en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En aspectos específicos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además mutaciones YTE, que presenta una solubilidad aparente aumentada medida mediante el uso de un ensayo de precipitación de polietilenglicol (PEG) en comparación con un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

Los productos biofarmacéuticos en almacenamiento cambian a medida que envejecen, pero se consideran estables siempre que sus características permanezcan dentro de las especificaciones del fabricante. El número de días que el producto permanece estable en las condiciones de almacenamiento recomendadas se conoce como la vida útil. Los protocolos experimentales comúnmente usados para la recopilación de datos que sirven como base para estimar la vida útil de un producto se denominan ensayos de estabilidad. La vida útil generalmente se estima de acuerdo con los tipos de pruebas de estabilidad: ensayos de estabilidad en tiempo real y ensayos de estabilidad acelerada. En los ensayos de estabilidad acelerada, un producto se almacena en condiciones de estrés elevado, por ejemplo, temperatura, humedad y pH. Véase, por ejemplo, Tydeman & Kirkwood, J. Biol. Stand. 12:195-206 (1984); Some et al., J. Pharm. Sci. 90:1759-66 (2001); FDA. Pautas para la presentación de documentación para la estabilidad de fármacos y productos biológicos humanos. Rockville (MD), 1987.

En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que presenta un aumento en la estabilidad medido usando un ensayo de estabilidad acelerado en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FESYTE. En algunos aspectos, se proporciona un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 252, 254 y 256 de UE (por ejemplo, mutaciones Y, YT, YE, YTE), que presenta un aumento en la estabilidad medido usando un ensayo de estabilidad acelerado en comparación con los mismos polipéptidos que comprenden un dominio Fc de IgG variante FES-YTE. En aspectos específicos, se presenta un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ, FQG o FAQ que comprende además mutaciones YTE, que presenta un aumento en la estabilidad medido usando un ensayo de estabilidad acelerada en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante FES-YTE.

En algunos aspectos, el ensayo de estabilidad acelerada comprende la incubación de un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG durante un período prolongado de tiempo y/o incubación a alta temperatura. En otros aspectos, el ensayo de estabilidad acelerada se realiza mediante incubación de un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG a una alta concentración. En algunos aspectos, las mediciones en el ensayo de estabilidad acelerada se realizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). En otros aspectos, las mediciones en el ensayo de estabilidad acelerada se realizan usando dispersión de luz dinámica (DSL). Un experto en el arte apreciaría que la agregación de polipéptidos se puede medir mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

En algunos aspectos, el período de tiempo prolongado en el ensayo de estabilidad acelerada es de al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, o al menos cuatro meses. En otros aspectos, el período de tiempo prolongado en el ensayo de estabilidad acelerada es aproximadamente una semana, aproximadamente dos semanas, aproximadamente tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses o aproximadamente cuatro meses.

En algunos aspectos, la concentración del polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG usado en el ensayo de estabilidad acelerada es al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 35 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 45 mg/ml, o al menos 50 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración del polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG usado en el ensayo de estabilidad acelerada es de aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml.

En algunos aspectos, la temperatura usada en el ensayo de estabilidad acelerada es al menos 30 °C, al menos 35 °C, al menos 40 °C, al menos 45 °C, al menos 50 °C, al menos 55 °C, o al menos 60 °C. En algunos aspectos, la alta temperatura usada en el ensayo de estabilidad acelerada es de aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35

°C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, o aproximadamente 60 °C.

Métodos

- 5 En algunos aspectos, se presenta un método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) en un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante, que comprende (a) sustitución del aminoácido en la posición 234 de UE en el dominio Fc con fenilalanina (F); (b) sustitución del aminoácido en la posición 235 de UE en el dominio Fc con alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q) o valina (V); y (c) sustitución del aminoácido en la posición 322 de UE del dominio Fc con alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N) o glutamina (Q); o sustitución del aminoácido en la posición 331 de UE del dominio Fc con alanina (A) o glicina (G). En algunos aspectos, el dominio Fc del polipéptido original comprende una tirosina (Y) en la posición 252 de UE; y/o una treonina (T) en la posición 254 de UE; y/o, un ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE. En algunos aspectos específicos, el dominio Fc del polipéptido original comprende una tirosina (Y) en la posición 252 de UE, una treonina (T) en la posición 254 de UE, y un ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE, esto es, el dominio Fc del polipéptido original es un dominio Fc de IgG variante YTE.
- 10
- 15 En algunos aspectos, se presenta un método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y aumentar la semivida de un polipéptido original que comprende un dominio Fc de IgG, que comprende (a) sustitución del aminoácido en la posición de UE 234 en el dominio Fc con fenilalanina (F); (b) sustitución del aminoácido en la posición 235 de UE en el dominio Fc con alanina (A), asparagina (N), fenilalanina (F), glutamina (Q) o valina (V); y (c) sustitución del aminoácido en la posición 322 de UE del dominio Fc con alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N) o glutamina (Q); o sustitución del aminoácido en la posición 331 de UE del dominio Fc con alanina (A) o glicina (G); y (d) sustitución del aminoácido en la posición 252 de UE con tirosina (Y). En algunos aspectos, el método comprende además sustitución del aminoácido en la posición 254 de UE con treonina (T); y, sustitución del aminoácido en la posición 256 de UE con ácido glutámico (E).
- 20
- 25 En algunos aspectos, el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y aumentar la semivida descrito anteriormente comprende la sustitución del aminoácido en la posición 234 de UE en el dominio Fc con fenilalanina (F); la sustitución del aminoácido en la posición 235 de UE en el dominio Fc con glutamina (Q); y la sustitución del aminoácido en la posición 322 de UE en el dominio Fc con glutamina (Q).
- 30 En algunos aspectos, el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y aumentar la semivida descrito anteriormente comprende la sustitución del aminoácido en la posición 234 de UE del dominio Fc con fenilalanina (F); la sustitución del aminoácido en la posición 235 de UE del dominio Fc con glutamina (Q); y la sustitución del aminoácido en la posición 331 de UE del dominio Fc con glicina (G).
- 35 En algunos aspectos, el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y el método para disminuir la función efectora inducida por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC) y aumentar la semivida descrito anteriormente comprende la sustitución del aminoácido en la posición 234 de UE del dominio Fc con fenilalanina (F); la sustitución del aminoácido en la posición 235 de UE del dominio Fc con alanina (A); y la sustitución del aminoácido en la posición 322 de UE del dominio Fc con glutamina (Q).
- 40 Anticuerpos y fragmentos de los mismos.
- 45 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante comprende un dominio de unión a antígeno. En algunos aspectos específicos, el dominio de unión a antígeno puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El dominio de unión a antígeno puede ser un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo. En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno comprende, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla; un díacuerpo una cadena polipeptídica de un anticuerpo; un fragmento F(ab)₂; o, y fragmento F(ab).
- 50 El término "variante de anticuerpo" se refiere a un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento, en el que el polipéptido es un anticuerpo. Las variantes de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos que contienen el dominio Fc de cualquiera de los anteriores. En algunos aspectos, las variantes de anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, esto es, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno, en el que estos fragmentos se pueden fusionar o conjugar con otro dominio de inmunoglobulina que comprende un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento. En un aspecto, las variantes de anticuerpos son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano.
- 55

Las variantes de anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos (por

ejemplo, humanos, un roedor tal como ratón o rata, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). En un aspecto específico, se proporciona una variante de anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. Como se usa en este documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y también incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de ratones que expresan anticuerpos de genes humanos.

Una variante de anticuerpo puede ser monoespecífica, biespecífica, triespecífica o tener mayor especificidad (anticuerpos multiespecíficos). Las variantes de anticuerpos multiespecíficos se pueden unir específicamente a diferentes epítopos de la molécula diana deseada o se pueden unir específicamente tanto a la molécula diana como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 94/04690; WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; y WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920, y 5,601,819; y Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547 (1992)). Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos son conocidos en la técnica.

Métodos de producción de anticuerpos que comprenden dominios Fc de IgG variante

Las variantes de anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante.

Las variantes de anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de hibridoma, recombinante y tecnologías de expresión en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, las variantes de anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies y T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los métodos de producción y cribado de anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y conocidos en la técnica.

Las variantes de anticuerpos se pueden generar mediante numerosos métodos bien conocidos para un experto en el arte. Los ejemplos no limitantes incluyen aislar regiones codificantes de anticuerpos (por ejemplo, de hibridomas) e introducir una o más sustituciones de aminoácidos del dominio Fc en la región codificante de anticuerpos aislados. Alternativamente, las regiones variables pueden subclonarse en un vector que codifica un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento.

Los fragmentos de variantes de anticuerpos que reconocen epítopos específicos se pueden generar mediante cualquier técnica conocida para los expertos en el arte. Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de variantes de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser ventajoso usar variantes de anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos que comprenden un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Una variante de anticuerpo quimérico o fragmento del mismo que comprende un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento también puede hacerse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202(1989); y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397, y 6,311,415. En ciertos casos, una variante de anticuerpo humanizado o fragmento del mismo puede comprender un dominio de IgG Fc variante proporcionado en este documento. Las variantes de anticuerpos humanizados se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (Patente Europea No. EP 239,400; Publicación Internacional No. WO 91/09967; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), enchapado o revestimiento (Patentes Europeas Nos. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805-814 (1994); y Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973 (1994)), transposición de cadenas (la Patente de los Estados Unidos No. 5,565,332), y las técnicas descritas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,407,213 y 5,766,886, Publicación Internacional No. WO 9317105, Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13:353-60 (2000), Morea et al., Methods 20:267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9:895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55:1717-22 (1995), Sandhu, Gene 150:409-10 (1994), y Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235:959-73 (1994).

Las variantes de anticuerpos humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón.

- Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular,
- 5 la delección homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado o fragmentos inmunogénicos del mismo.
- 10 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. De este modo, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase
- 15 Lonberg and Huszar, *Int. Res. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos de producción de tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318, y 5,939,598.
- 20 **Polinucleótidos**
- Se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante. También se proporciona un polinucleótido que se hibrida en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, intermedia o de menor rigurosidad con un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG.
- En algunos aspectos, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede producir a partir de una secuencia de polinucleótidos originales obtenida de una fuente apropiada. Una vez que se ha obtenido la secuencia de polinucleótidos, la secuencia de polinucleótidos puede manipularse usando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, que se incorporan por referencia en este documento en su totalidad), para generar un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG que tiene una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.
- 30 En otros aspectos, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmejer et al. *BioTechniques* 17:242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia codificante, hibridación y ligado de esos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.
- 35 **Antígenos específicos y socios de fusión**
- 40 Prácticamente cualquier molécula puede ser dirigida por una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, proteína de fusión o conjugado que comprende un dominio Fc de IgG variante. Además, se puede incorporar virtualmente cualquier molécula en una proteína de fusión o un conjugado que comprenda un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento.
- Estas moléculas específicas dirigidas y/o socios de fusión incluyen, pero no se limitan a, la siguiente lista de proteínas, así como subunidades, dominios, motivos y epítomos que pertenecen a la siguiente lista de proteínas: renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humano y la hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora folicular; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VII, factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF) y factor von Willebrands; factores anticoagulantes tales como la proteína C; factor natriurético auricular; surfactante pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulado en la activación normalmente de células T expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como la albúmina de suero humana; sustancia inhibidora de Muellerian; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento tales como, por ejemplo, EGFR, VEGFR; interferones tales como alfa interferón (α-IFN), beta interferón (β-IFN) e interferón gamma

5 γ -IFN); proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tales como AFGF y PFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 o TGF-5; factor de crecimiento similar a la insulina I y -II (IGF-I e IGF-II); des (1-3) - IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD 8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD33, CD34, CD40, CD40L, CD52, CD63, CD64, CD80 y CD147; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-13; TNF α , superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana superficial; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del AIDS, por ejemplo, gp120; proteínas de transporte; receptores de referencia; adreínas; proteínas reguladoras; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac 1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, ICAM-3 y VCAM, integrina $\alpha 4/p7$ y (integrina Xv/p3 que incluye ya sea una o subunidades de la misma, subunidades integrina alfa tales como CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, alfa7, alfa8, alfa9, alfaD, CD11a, CD11b, CD51, CD11c, CD41, α fallb, α falELb; subunidades de integrina beta tales como, CD29, CD 18, CD61, CD104, beta5, beta6, beta7 y beta8; combinaciones de subunidades de integrina que incluyen, pero no limitando a, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ y $\alpha 4\beta 7$; un miembro de una vía de apoptosis; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mp1; CTLA-4; proteína C; un receptor Eph tales como EphA2, EphA4, EphB2, etc.; un antígeno leucocitario humano (HLA) tal como HLA-DR; proteínas complementarias tales como receptor de complemento CR1, C1Rq y otros factores del complemento tal como C3, y C5; un receptor de glucoproteína tal como Gplb α , GPIIb/IIIa y CD200; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

25 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, proteína de fusión o conjugado) se puede específicamente a antígenos cancerosos que incluyen, pero no se limitan a, receptor ALK (receptor de pleiotrofina), pleiotrofina, antígeno de pancarcinoma KS 1/4; antígeno de carcinoma de ovario (CA125); fosfato de ácido prostático; antígeno prostático específico (PSA); antígeno asociado a melanoma p97; antígeno de melanoma gp75; antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA); antígeno de membrana específico de próstata; antígeno carcinoembrionario (CEA); antígeno de mucina epitelial polimórfico; antígeno de glóbulos grasos de leche humana; antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 y LEA; antígeno de linfoma de Burkitt-38.13; CD19; antígeno de linfoma B humano-CD20; CD33; antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2 y gangliósido GM3; trasplante específico de tumor tipo antígeno de superficie celular (TSTA); antígenos tumorales inducidos por virus que incluyen antígeno T, virus tumorales de ADN y antígenos envoltantes de virus tumorales de ARN; antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, glicoproteína trofoblástica oncofetal 5T4 y antígeno oncofetal de tumor de vejiga; antígeno de diferenciación tal como antígenos de carcinoma de pulmón humano L6 y L20; antígenos de fibrosarcoma; antígeno de células T de leucemia humana-Gp37; neoglicoproteína; esfingolípidos; antígenos de cáncer de mama tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); NY-BR-16; NY-BR-16 y antígeno HER2 (p185HER2); mucina epitelial polimórfica (PEM); antígeno linfocitario humano maligno-APO-1; antígeno de diferenciación tal como el antígeno I encontrado en los eritrocitos fetales; antígeno primario del endodermo I encontrado en eritrocitos adultos; embriones de preimplantación; I (Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos; M18, M39 encontrado en el epitelio mamario; SSEA-1 encontrado en células mieloides; VEP8; VEP9; Myl; Va4-D5; D156-22 encontrado en cáncer colorrectal; TRA-1-85 (grupo sanguíneo H); SCP-1 encontrado en testículos y cáncer de ovario; C14 encontrado en adenocarcinoma de colon; F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón; AH6 encontrado en cáncer gástrico; hapteno Y; Ley encontrado en células de carcinoma embrionario; TL5 (grupo sanguíneo A); receptor de EGF encontrado en células A431; serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrada en el cáncer de páncreas; FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario; antígeno de adenocarcinoma gástrico; CO-514 (grupo sanguíneo Lea) encontrado en Adenocarcinoma; NS-10 encontrado en adenocarcinomas; CO-43 (grupo sanguíneo Leb); G49 encontrado en el receptor de EGF de células A431; MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) encontrado en adenocarcinoma de colon; 19.9 encontrado en el cáncer de colon; mucinas de cáncer gástrico; T5A7 encontrado en células mieloides; R24 encontrado en melanoma; 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, y M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones en estadio de 4 a 8 células; antígeno de linfoma cutáneo de células T; antígeno MART-1; antígeno de Sialy Tn (STn); antígeno de cáncer de colon NY-CO-45; antígeno de cáncer de pulmón NY-LU-12 valient A; antígeno de adenocarcinoma ART1; antígeno cancerígeno paraneoplásico asociado al testículo cerebral (antígeno onconeural MA2); antígeno neuronal paraneoplásico; antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2); gen de antígeno de carcinoma hepatocelular 520; antígeno asociado a tumor CO-029; antígenos asociados a tumores MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículo CT7), MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP), MAGE-B2 (DAM6), MAGE-2, MAGE-4-a, MAGE-4-by MAGE- X2; antígeno de cáncer de testículo (NY-EOS-1) y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

60 En otros aspectos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, proteína de fusión o conjugado) se puede unir específicamente a un agente infeccioso (por ejemplo, bacteria, virus). Las bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a, bacterias gramnegativas y grampositivas. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococci* y

especies de *Streptococcus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: especies de *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*. Los virus incluyen, pero no se limitan a, enterovirus, rotavirus, adenovirus, virus de la hepatitis. Los ejemplos específicos de virus que se han encontrado en humanos incluyen, pero no se limitan a: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana (HIV)); Picomaviridae (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo, Cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (por ejemplo, Virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunta, flebovirus y virus de Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbiviruses y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvoviruses); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (CMV)); Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, virus pox); Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta, los agentes de la hepatitis no A, no B; Norwalk y virus relacionados y astrovirus).

Conjugados y Derivados

En algunos aspectos, un dominio Fc de IgG variante proporcionado en este documento se puede conjugar o fusionar a uno o más unidades estructurales, que incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas.

En algunos aspectos, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG incluye derivados que se modifican, por ejemplo, mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o modificación química o enzimática. Por ejemplo, los derivados incluyen polipéptidos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG se puede unir a una molécula de polímero tal como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). El PEG se puede unir a un polipéptido con o sin un enlazante multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica del sitio del PEG al extremo N o C del polipéptido o mediante grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se puede usar la derivación de polímeros lineal o ramificada que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica.

Se proporcionan conjugados que comprenden un dominio variante Fc de IgG que contiene un polipéptido conjugado químicamente (que incluye conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento de la misma, a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos). La conjugación no necesariamente debe ser directa, sino que puede ocurrir a través de un enlazante. Tales moléculas enlazantes se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al. Clin Cancer Res 4:2483 (1998); Peterson et al. Bioconjug. Chem. 10:553 (1999); Zimmerman et al. Nucl. Med. Biol. 26:943 (1999); Garnett, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171 (2002).

También se proporcionan composiciones que comprenden proteínas heterólogas, péptidos o polipéptidos conjugados con un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG. Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; las Patentes Europeas Nos. EP 307,434 y EP 367,166; las Publicaciones Internacionales Nos. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-39 (1991.); Zheng et al. J. Immunol. 154:5590-5600 (1995); y Vil et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-41 (1992).

5 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG se conjuga con un agente de diagnóstico o detectable. Tales conjugados pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el desarrollo o la progresión de un trastorno inflamatorio como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección se pueden lograr mediante el acoplamiento de un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG a sustancias detectables.

10 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG se conjuga con un agente terapéutico. Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede conjugar con una unidad estructural terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células.

15 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede conjugar con un agente terapéutico o unidad estructural de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o unidades estructurales de fármacos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, una citocina o un factor de crecimiento.

Además, un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG se puede conjugar con una unidad estructural terapéutica tal como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones de radiometal (véase arriba para ejemplos de materiales radiactivos).

20 Un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG variante descrito en este documento, esto es, una variante de anticuerpo, se puede conjugar con una unidad estructural terapéutica. Las técnicas para conjugar unidades estructurales terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al. *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).
 25 Alternativamente, la variante de anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980.

30 En algunos aspectos, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG comprende una o más glucoformas modificadas genéticamente, esto es, una composición de carbohidratos que se une covalentemente al polipéptido. Los glucoformas diseñados pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen, pero no se limitan a, la
 35 reducción de la función efectora. Los glucoformas modificados genéticamente se pueden generar mediante cualquier método conocido para un experto en el arte, por ejemplo, usando cepas de expresión variantes o modificadas, mediante coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT11), expresando un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando carbohidratos después de que se ha expresado un polipéptido que contiene el
 40 dominio variante Fc de IgG. Los métodos para generar glucoformas modificadas por ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Umana et al., *Nat. Biotechnol.* 17:176-180 (1999); Davies et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74:288-294 (2001); Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 (2002); Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473 (2003); Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-49 (2004); la Patente de los Estados Unidos No. 6,602,684; la Publicación de los Estados Unidos No. 2009/0004179, las Publicaciones Internacionales
 45 Nos. WO 00/61739, WO 01/292246, WO 02/311140, WO 02/30954, y WO 07/005786.

Proteínas de fusión

50 Una proteína de fusión Fc combina un dominio Fc de una inmunoglobulina o fragmento de la misma, con un socio de fusión, que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido, péptido o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de la proteína de fusión Fc, esto es, el socio de fusión, es a menudo pero no siempre para mediar la unión al objetivo, y de este modo es funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, se proporciona una proteína de fusión, esto es, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG y un socio de fusión que se une específicamente a una molécula (por ejemplo, un receptor de la superficie celular, quimiocina, etc.).

55 En algunos aspectos, una proteína de fusión puede comprender un péptido, polipéptido, esqueleto de proteínas, scFv, dsFv, diacuerpo, Tandab, o un mimético de anticuerpo fusionado a un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante. En algunos aspectos, una proteína de fusión puede comprender una región enlazadora que conecta un péptido, polipéptido, esqueleto de proteínas, scFv, dsFv, diacuerpo, Tandab o un anticuerpo mimético a un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante. El uso de enlaces peptídicos naturales y artificiales para conectar polipéptidos en nuevos polipéptidos de fusión unidos es bien conocido en la literatura (Hallewell et al., J.

Biol. Chem. 264, 5260-5268 (1989); Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731 (1995); Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116 (1996); Khandekar et al., J. Biol. Chem. 272, 32190-32197 (1997); Fares et al. (1998), Endocrinology 139, 2459-2464; Smallshaw et al. (1999), Protein Eng. 12, 623-630; la Patente de los Estados Unidos No. 5,856,456).

5 En algunos aspectos, una proteína de fusión puede combinar un dominio Fc de IgG variante con un socio de fusión que en general puede ser una proteína, que incluye, pero no se limita a, un ligando, una enzima, la porción de ligando de un receptor, una proteína de adhesión, o alguna otra proteína o dominio. Véase, por ejemplo, Chamow et al., Trends Biotechnol. 14:52-60 (1996); Ashkenazi et al., Curr. Opin. Immunol. 9:195-200 (1997); Heidaran et al., FASEB J. 9:140-5 (1995).

10 En un aspecto, una proteína de fusión puede comprender un dominio Fc de IgG variante fusionado a una unidad estructural que se une específicamente a una molécula diana, en el que la molécula diana es, por ejemplo, un ligando, un receptor o un fragmento del mismo. Una proteína de fusión puede comprender un dominio Fc de IgG variante que comprende las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente, por ejemplo, mutaciones del dominio Fc FQQ, FAQ, o FQG y puede comprender además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de UE 252, 254 y 256, por ejemplo, mutaciones del dominio Fc Y, YT, YE, YTE.

En un aspecto específico, una proteína de fusión comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, una glutamina (Q) en la posición 235 de UE y una glutamina (Q) en la posición 322 de UE. En algunos aspectos, una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de IgG variante FQQ comprende además una tirosina (Y) en la posición 252 de UE, una treonina (T) en la posición 254 de UE y un ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

En otro aspecto, una proteína de fusión comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, una glutamina (Q) en la posición 235 de UE y una glicina (G) en la posición 331 de UE. En algunos aspectos, una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de IgG variante FQG comprende además una tirosina (Y) en la posición 252 de UE, una treonina (T) en la posición 254 de UE y un ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

En otro aspecto más, una proteína de fusión comprende un dominio Fc de IgG variante que comprende una fenilalanina (F) en la posición 234 de UE, una alanina (A) en la posición 235 de UE y una glutamina (Q) en la posición 322 de UE. En algunos aspectos, una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de IgG variante FAQ comprende además una tirosina (Y) en la posición 252 de UE, una treonina (T) en la posición 254 de UE y un ácido glutámico (E) en la posición 256 de UE.

En otro aspecto, una proteína de fusión comprende una molécula bioactiva fusionada a un dominio Fc de IgG variante descrito en este documento. Moléculas bioactivas que se pueden fusionar a un dominio Fc de IgG variante descrito en este documento, pero no se limitan a péptidos, polipéptidos, proteínas, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. En un aspecto, una molécula bioactiva es un polipéptido que comprende al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, y es heterólogo a la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de IgG variante descrito en este documento.

Una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de IgG variante descrito en este documento se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como, pero sin limitación, un péptido, para facilitar la purificación. En algunos aspectos, la secuencia marcadora de aminoácidos es una etiqueta His6, una etiqueta de "flag", una etiqueta de hemaglutinina "HA" o una de muchas otras etiquetas disponibles comercialmente.

Se puede usar una variedad de enlazantes para unir covalentemente un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG a un socio de fusión para generar una proteína de fusión. Alternativamente, los polipéptidos, proteínas y proteínas de fusión se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar o mediante técnicas de síntesis de proteínas, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos.

Expresión de polipéptido recombinante

La expresión recombinante de un dominio variante Fc de IgG que contiene polipéptido, derivado, análogo o fragmento del mismo, por ejemplo, una variante de anticuerpo o una proteína de fusión que comprende un dominio variante Fc de IgG descrito en este documento, se puede lograr mediante la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo o una proteína de fusión), el vector para la producción del polipéptido se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica.

55 De este modo, los métodos de preparación de una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo,

una variante de anticuerpo o una proteína de fusión) se describen en este documento. Los métodos que son bien conocidos para los expertos en el arte se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. De este modo, se proporcionan vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, unido operativamente a un promotor.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan luego mediante técnicas convencionales para producir un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG. De este modo, se proporcionan células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante, unido operativamente a un promotor heterólogo.

Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,807,715). Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden ser producidas y posteriormente purificadas, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar un polipéptido que comprende un dominio Fc de IgG variante *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen una secuencia o secuencias que codifican un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen una secuencia o secuencias que codifican un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia o secuencias que codifican un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia o secuencias que codifican un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero o de virus de mamífero.

Se puede elegir una cepa de la célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado de la transcripción primaria, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0, CRL7030 y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se pueden diseñar usando métodos conocidos en la técnica.

Una vez que se ha producido un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo o una proteína de fusión) por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

Caracterización y ensayos funcionales

Un polipéptido que contiene el dominio variante Fc de IgG se puede caracterizar de varias maneras. En particular, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede analizar para determinar la capacidad de unirse específicamente a un ligando, por ejemplo, FcγRIIA, FcγRIIA (158V), C1q. Dicho ensayo se puede realizar en solución (véase, por ejemplo, Houghten, *Bio/Techniques* 13:412-421 (1992)), en cuentas (véase, por ejemplo, Lam, *Nature* 354:82-84 (1991)), en chips (véase, por ejemplo, Fodor, *Nature* 364:555-556 (1993)), sobre bacterias (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,223,409), sobre plásmidos (véase, por ejemplo, Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869 (1992)), o en fago (véase, por ejemplo, Scott and Smith, *Science* 249:386-390 (1990); Devlin, *Science* 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1990); y Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991)). Las moléculas que se han identificado para unirse específicamente a un ligando, por ejemplo, FcγRIIA, FcγRIIA, C1q, se pueden analizar para determinar su afinidad por el ligando.

Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede analizar para la unión específica a una molécula tal como un antígeno (por ejemplo, antígeno de cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos) o un ligando (por ejemplo, FcγR) por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión específica y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, etc. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York.

La afinidad de unión de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG a una molécula tal como un antígeno o un ligando, por ejemplo, FcγR, y la velocidad de la interacción se pueden determinar mediante ensayos de unión competitivos. Los parámetros cinéticos de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG también se pueden determinar usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) conocido en la técnica (por ejemplo, análisis cinético BIAcore o ProteOn). Véase, por ejemplo, Mullet et al. *Methods* 22: 77-91 (2000); Dong et al. *Rev. Mol. Biotech.* 82: 303-23 (2002); Fivash et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 97-101 (1998); Rich et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 54-61 (2000). Además, cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; 6,268,125 se contemplan en los métodos de la presente divulgación.

La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas para los expertos en el arte, se puede usar para caracterizar la unión de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG a una molécula expresada en la superficie celular (por ejemplo, un FcγR).

Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede analizar para determinar su capacidad para mediar la función de la célula efectora mediada por FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que se pueden analizar incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento (CDC). Se puede usar cualquier ensayo basado en células o sin células conocido para los expertos en el arte para determinar la actividad de la función celular efectora (véase, por ejemplo, Perussia et al. *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92 (2000); Baggiolini et al. *Experientia* 44: 841-8 (1998); Lehmann et al. *J. Immunol. Methods* 243: 229-42 (2000); Brown, *Methods Cell Biol.* 45: 147-64 (1994); Munn et al. *J. Exp. Med.* 172: 231-237 (1990); Abdul-Majid et al. *Scand. J. Immunol.* 55:70-81 (2002); Ding et al. *Immunity* 8:403-411 (1998)). En particular, se puede analizar un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, células asesinas naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos para los expertos en el arte (véase, por ejemplo, Perussia et al. *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92 (2000)).

Los métodos para caracterizar la capacidad de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG para unirse a C1q y mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar la unión de C1q, se puede realizar un ELISA de unión de C1q. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, o combinaciones de los mismos formuladas junto con un portador. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, proteínas de fusión o conjugados. En algunos aspectos, tales composiciones son fisiológicamente tolerables y, como tales, son apropiadas para la administración terapéutica, profiláctica o diagnóstica a un sujeto.

En otro aspecto, las composiciones que comprenden un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado) o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante pueden incluir uno o más sales farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos apropiados que pueden emplearse en las composiciones contempladas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tales como oliva aceite y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

- En otro aspecto, las composiciones que comprenden un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado) o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG también pueden contener agentes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.
- Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En algunos aspectos, los portadores aceptables incluyen excipientes aprobados o considerados seguros para la administración humana y animal, esto es, sustancias GRAS (generalmente consideradas como seguras). Las sustancias GRAS están enumeradas por the Food and Drug administration in the Code of Federal Regulations (CFR) en 21 CFR 182 y 21 CFR 184, incorporadas en este documento como referencia.
- Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado) o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG pueden ser variado para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.
- Una dosificación terapéuticamente eficaz de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, o una composición farmacéutica del mismo da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de degradación o discapacidad debido a la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz también puede prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, cualquier ensayo de monitoreo clínico o bioquímico se puede usar para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente eficaz. Un experto habitual en el arte podría determinar tales cantidades en función de factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.
- Una composición que comprende un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado) o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en el arte, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas seleccionadas de composiciones de administración que comprenden un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, y las composiciones farmacéuticas del mismo incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, para ejemplo por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaco, intradérmico, intraperitoneal, transtraqueal, subcutáneo, subcuticular, intraarticular, inyección e infusión subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, las composiciones que comprenden un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, y las composiciones farmacéuticas del mismo se pueden administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.
- Métodos de tratamiento
- Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado) o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede administrar a un animal, en particular a un mamífero, específicamente, un humano, para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección.

Un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante puede ser particularmente útil para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en los que una eficacia alterada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC y/o CDC) es deseado.

- 5 Un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante, y composiciones del mismo pueden ser particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedad neoplásica primaria o metastásica (esto es, cáncer), enfermedad autoinmune, y enfermedades infecciosas. Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en este documento. Como se detalla a continuación, un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede usar en métodos para tratar o prevenir el cáncer (particularmente en inmunoterapia pasiva), enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas.
- 10
- 15 Un polipéptido que contiene un dominio Fc de IgG variante o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, y composiciones de los mismos también se pueden usar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de un cáncer, enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas. Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG, y composiciones de los mismos también se pueden usar ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tal como, por ejemplo agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales.
- 20

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con cáncer y afecciones relacionadas mediante la administración de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG.

25

Un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG se puede usar para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto.

La divulgación también abarca métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG. Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o prevenidas por un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

30

Kits

35 También se proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento. Opcionalmente asociado con tal (es) contenedor (es) puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana. La presente divulgación proporciona kits que se pueden usar en los métodos de tratamiento y administración anteriores. En un aspecto, un kit comprende un polipéptido que contiene un dominio variante Fc de IgG (por ejemplo, una variante de anticuerpo, una proteína de fusión o un conjugado), preferiblemente en forma purificada, en uno o más recipientes.

40

Ejemplos

Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y de ninguna manera deben interpretarse como limitantes de las reivindicaciones, sino que deben interpretarse para abarcar todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

45

Ejemplo 1

Generación de dominios Fc Variante y producción y purificación de anticuerpos

Se introdujeron mutaciones en la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado de glucoproteína F anti-RSV motavizumab (MEDI 532, Numax™; véase Wu et al., J. Mol. Biol. 350: 126-144 (2005); Wu et al., J. Mol. Biol. 368: 652-65 (2007)) (en lo que sigue denominado "Ab1"), un anticuerpo anti-IL-4R (véase, por ejemplo, U.S. 8,092,804) (en lo que sigue como "Ab2"), el anticuerpo anti-CD20 HB20.3 (véase, por ejemplo, US 2009/0136516; US 2009/0155275) (en lo que sigue denominado "Ab3"), o el anticuerpo anti-C5a 1B8 (en lo que sigue denominado "Ab4"). Las mutaciones se introdujeron por mutagénesis dirigida a un sitio usando PCR por extensión de solapamiento (véase, por ejemplo, Ho et al., Gene 77: 51-59 (1989)). Los cebadores que contenían las mutaciones deseadas se usaron para amplificar regiones del gen de la cadena pesada. Estos fragmentos se

50

55

combinaron (si es necesario) para generar fragmentos de genes IgG1 Fc humanos de longitud completa con la mutación deseada. Los fragmentos de PCR finales se clonaron individualmente en vectores de expresión de mamíferos que codifican la cadena pesada. Este procedimiento resultó en el reemplazo de la parte constante de la cadena pesada de tipo salvaje del anticuerpo por las diferentes contrapartes modificadas con Fc. La secuenciación de ADN usada para verificar las construcciones fue realizada por Genewiz (South Plainfield, NJ),

Todas las construcciones se expresaron transitoriamente en células HEK293F usando 293fectin™ (Invitrogen) como reactivo de transfección y se cultivaron en medio Freestyle™ libre de suero de Invitrogen. El medio de cultivo se recogió 10 días después de la transfección, y todos los formatos de anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar de acuerdo con el protocolo del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los anticuerpos se intercambiaron posteriormente con solución reguladora en histidina-HCl 25 mM (pH 6.0) y se analizó la pureza de las construcciones usando SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y con cromatografía analítica de exclusión por tamaño. Se usó cromatografía preparativa de exclusión por tamaño para obtener muestras de IgG pura de 99 a 100%.

Ejemplo 2

Mediciones de estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y SYPRO® Orange Fluorimetría diferencial de barrido (DSF)

La inestabilidad de los dominios de IgG puede correlacionarse con las propiedades químicas, de fabricación y de control (CMC) desfavorables, tales como la disminución de la estabilidad térmica y la solubilidad, el aumento de la agregación o la fragmentación que finalmente conducen a una mayor pérdida de pureza, opciones limitadas de formulación/entrega y otros desafíos de desarrollo.

Los experimentos de DSC se llevaron a cabo usando un microcalorímetro diferencial de barrido Microcal VP-DSC (Microcal, Northampton, MA). Todas las soluciones y muestras usadas para DSC se filtraron usando un filtro de 0.22 μm y se desgasificaron antes de cargarlas en el calorímetro. Los anticuerpos usados para los estudios de DSC fueron > 95% monoméricos según lo juzgado por cromatografía analítica de filtración en gel. Antes del análisis DSC, todas las muestras se dializaron exhaustivamente (al menos tres intercambios de solución reguladora) en histidina-HCl 25 mM (pH 6). La solución reguladora de esta diálisis se usó luego como solución reguladora de referencia para experimentos DSC posteriores. Antes de la medición de la muestra, se obtuvieron las medidas de referencia (solución reguladora versus solución reguladora) para restar de la medición de la muestra. Se agregaron muestras dializadas (a una concentración de 1 mg/ml) al pocillo de muestra y se realizaron mediciones de DSC a una velocidad de exploración de 1 °C/min. El análisis y la desconvolución de los datos se llevaron a cabo usando el software Origin™ DSC proporcionado por Microcal.

Para experimentos con DSF, se agregó SYPRO® Orange a anticuerpos a una concentración de 0.5 mg/ml en histidina-HCl 25 mM (pH 6) (Goldberg et al., J. Pharm. Sci. 100: 1306-1315 (2011)). Se agregaron veinticinco microlitros de muestras preparadas por duplicado a placas de PCR de paredes blancas. Se usó un detector de PCR en tiempo real Chromo4 (Bio-Rad, Hercules, California) como un ciclador térmico, y la emisión de fluorescencia se detectó usando la rutina de calibración de tinte personalizada del software. La placa de PCR que contiene las muestras de prueba se sometió a una rampa de temperatura de 20 °C a 90 °C en incrementos de 0.2 °C con pausas de 10 segundos después de cada incremento de temperatura. La T_m se calculó mediante el software usando un segundo método matemático derivado para calcular el punto de inflexión de la curva. La T_m informada es un promedio de tres mediciones.

Se introdujeron mutaciones en la región Fc de Ab1 o Ab2. Cuando se introdujeron las mutaciones FES e YTE en los dominios Fc de Ab1 y Ab2 (véanse los datos correspondientes a IgG1-FES-YTE en la tabla 4), se observaron una disminución de la estabilidad térmica y una mayor pérdida de pureza. Ab1 y Ab2 mostraron una pérdida de 14 °C y 13 °C respectivamente en estabilidad térmica (medida por DSC). Las variantes de anticuerpos FES-YTE (anticuerpos de IgG1-FES-YTE en la tabla 5) también mostraron una pérdida de pureza significativamente más que sus contrapartes de tipo salvaje o YTE (cuando se midieron a 40 °C, durante un mes usando un ensayo de estabilidad acelerado).

Tabla 5. DSC y mediciones de estabilidad acelerada en anticuerpos Ab1 y Ab2

Ab1			
	IgG1 WT	IgG1-YTE	IgG1-FES-YTE
T_m más baja (°C)*	70	63	56
% de pérdida de pureza/mes a 40 °C*	1.1	1.2	2.6

Ab2			
	IgG1 wt	IgG1-YTE	IgG1 FES-YTE
T_m más baja (°C)*	68	61	55
% de pérdida de pureza/mes a 40 °C*	6.0	6.8	8.4
Para 100 mg/ml de proteína en 25 mM histidina pH 6 solución reguladora Estabilidad relativa: WT = YTE> FES-YTE			
* El anticuerpo más bajo T_m corresponde con T_m del dominio CH2			

La inestabilidad térmica tras la adición del conjunto YTE de mutaciones o el FES-YTE afectó exclusivamente al dominio CH2 (Figura 1). Las trazas DSC de Ab4 mostraron que la T_m dominio CH2 disminuyó con la adición de las mutaciones YTE y FES-YTE, pero la estabilidad térmica de los dominios Fab y CH3 no se vio afectada. Aunque la estabilidad térmica disminuyó con la adición de YTE (véanse la Tabla 4 y la Figura 1), los aumentos significativos en la pérdida de pureza solo comenzaron cuando las mutaciones FES se introdujeron en combinación con las mutaciones YTE.

Para ayudar a construir un dominio Fc variante más estable térmicamente con las mismas propiedades biológicas que un dominio Fc variante con las mutaciones FES-YTE, se determinó la contribución a la estabilidad térmica de cada mutación FES mediante mutagénesis de disección y los resultados mostraron que la mutación UE L234F no tuvo ningún efecto sobre la estabilidad térmica, mientras que la mutación UE L235E y la mutación UE P331S mostraron aproximadamente una reducción de -2.5 y -3.5 °C, respectivamente, en la estabilidad térmica según lo determinado por DSC en el fondo de Ab3-YTE (esto es, las mutaciones UE L234F, UE L235E y UE P331S se introdujeron en un anticuerpo Ab3 cuyos dominios Fc ya contenían las mutaciones YTE).

Se generaron mutaciones alternativas en las posiciones de UE L235 y P331 del dominio Fc y se evaluó la estabilidad térmica mejorada (Tabla 6). Como la sustitución UE P331S se incluye principalmente en mutantes FES para disminuir la unión de C1q, también elegimos un sitio alternativo, en la posición de UE K322 (también conocida por disminuir la unión de C1q) para mutagenizar también (Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)).

Todos los anticuerpos que comprenden dominios Fc variante con las mutaciones elegidas (I, A, N, F, Q y V) en la posición de UE L235 mostraron una estabilidad térmica mejorada frente a los anticuerpos correspondientes que comprenden un dominio Fc variante con la mutación UE L235E aproximadamente 2 °C en el fondo L234F YTE Ab3.

En la posición de UE P331, las mutaciones de alanina y glicina mejoraron la estabilidad térmica solo modestamente (1 °C) en comparación con los anticuerpos con dominios Fc con las mutaciones FES-YTE (las mutaciones se introdujeron en el fondo UE L234F L235E YTE Ab3). En la posición de UE K322 (el sitio alternativo a la posición de UE P331) se crearon mutaciones en A, E, N, H y Q y se analizaron los incrementos de estabilidad térmica. Las sustituciones UE K322E, K322N y K322H en realidad resultaron en una disminución de la estabilidad térmica en comparación con FES-YTE. Cuando estas mutaciones se introdujeron en el fondo UE L234F L235E YTE Ab3, la T_m de CH2 disminuyó 0.3, 7 y 2.6 °C respectivamente. Las mutaciones UE K322A y K322Q en el fondo UE L234F L235E YTE Ab3 dieron como resultado mejoras en la estabilidad térmica frente a FES-YTE de 1.2 y 2.8 °C respectivamente.

Tabla 6. Mutaciones que mejoran la estabilidad térmica

Posición de UE	Mutaciones	Mejora de la estabilidad térmica*
L235	I, A, N, F, Q, V	~ 2 °C
P331	A, G†	~ 1 °C
K322‡	Q	~ 3 °C
Mutaciones en UE L235 se generaron en el fondo (L234F-YTE) Ab3;		
Mutaciones en UE P331 y UE K322 se generaron en el fondo (L234F, L235E-YTE) Ab3		
*Mejora sobre UE L234F/L235E/M252Y/S254T/T256E (FE-YTE) para UE L235;		
Mejora sobre UE L234F/L235E/P331S/M252Y/S254T/T256E (FES-YTE) para UE P331 y UE K322		

† Más eficaz para CDC de inactivación
 ‡ La mutación en UE K322 reemplaza la mutación en UE P331

5 A continuación, se realizan construcciones que combinaban las mutaciones más estables térmicamente en las posiciones de UE L235 y P331 o K322 para evaluar las mejoras de estabilidad térmica, mejoras en la pérdida de pureza y la estabilidad biofísica, así como el mantenimiento de las propiedades biológicas deseadas (tales como la unión de FcRn mejorada y falta de inducción de ADCC y CDC).

Se generaron dominios variante Fc FQG-YTE, FQQ-YTE y FAQ-YTE en los fondos Ab3 y Ab4. Las variantes Ab3 y Ab4 que comprenden los dominios variante Fc FQG-YTE, FQQ-YTE, y FAQ-YTE mostraron una mejora significativa de la estabilidad térmica (Figura 2) frente a las variantes Ab3 y Ab4 que comprenden mutaciones FES-YTE (Figura 1).

10 En el fondo Ab3, los mutantes FES-YTE tenían una T_m de CH2 de 55.6 °C. En contraste, las variantes Ab3 con mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE y FQQ-YTE tenían T_m de CH2 de 60.6 °C, 60.2 °C y 61.6 °C, respectivamente (Tabla 7), lo que indica que estas combinaciones de mutaciones del dominio Fc confirió estabilidad térmica mejorada al dominio CH2.

Tabla 7. Resultados de DSC y DSF.

Ab3	DSC	SYPRO Orange
	* T_{m1} °C	* T_{m1} °C
WT	69.2 (+13.6)	65.6 (+12.6)
YTE	62.7 (+7.1)	59.2 (+6.2)

15

(continuación)

Ab3	DSC	SYPRO Orange
YTE-FES	55.6	53
YTE-FE	60 (+4.4)	56.6 (+3.6)
YTE-FQQ	61.6 (+6)	59 (+6)
YTE-FAQ	60.6 (+5)	59 (+6)
YTE-FQG	60.2 (+4.6)	58.9 (+5.9)
Los valores en () son una mejora de T_{m1} sobre FES-YTE		
* T_{m1} corresponde con el dominio CH2		

Ejemplo 3

Análisis de unión de resonancia de plasmón superficial

20 Los anticuerpos que comprenden dominios variantes Fc de IgG con los tres mutantes combinados FQQ, FQF y FAQ y las mutaciones YTE se probaron para la unión a los receptores FcγR, C1q y FcRn para confirmar que poseían el mismo perfil de unión que los anticuerpos que comprenden los dominios variantes Fc de IgG con las mutaciones FES-YTE.

Los experimentos se realizaron usando el sistema de resonancia de plasmón superficial ProteOn XPR36 (Bio Rad). Se usó solución salina regulada con fosfato con Tween 20 al 0.005% (PBS/Tween), pH 7.4 como solución reguladora de ejecución para la mayoría de los experimentos con la excepción de la unión de FcRn humano (dominio extracelular) en la que se usó la solución salina regulada con fosfato con Tween 20 al 0.005% (PBS/Tween), pH 6.0. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Los anticuerpos se inmovilizaron en un chip sensor ProteOn™ GLC (# 176-5011) usando EDAC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) y sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) en un nivel de R.U. (unidad de respuesta) de 4000-6000. C1q, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII (158V), FcγRIII (158F) y FcRn se hicieron fluir sobre la superficie inmovilizada de IgG a diversas concentraciones a una velocidad de 25 μl/minuto para un período de tiempo suficientemente largo para alcanzar el estado estacionario, o cerca del estado estacionario. La unión (si se pudo determinar alguna) se cuantificó mediante un análisis de unión de equilibrio en estado estacionario usando el software ProteOn. Los dominios extracelulares humanos FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII (158V), FcγRIII (158F) y FcRn se generaron mediante vectores de expresión de mamíferos en casa. Se obtuvo C1q humano de Quidel (CA).

Los anticuerpos que comprenden dominios Fc IgG variante con mutaciones FES-YTE, FAQ-YTE, FQG-YTE o FQQ-YTE no mostraron unión cuantificable a FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (158V), FcγRIIIa (158F) o C1q a través de SPR (ProteOn) (Las Tablas 8 y 9). La unión de FcRn para anticuerpos que comprenden dominios Fc IgG variante con mutaciones FQQ-YTE o FQG-YTE fueron similares a los valores obtenidos para los anticuerpos que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones FES-YTE o YTE, lo que indica que se mantiene una unión de FcRn mejorada a pH 6.0 (Las Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Receptor FcγR, C1q y unión de FcRn a variantes de Ab3 medidas por SPR

Ab3	FcγRIIIa (158V)	FcγRIIIa (158F)	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIa	C1q	FcRn
WT	900 nM	4.7 μM	1.2 μM	6 μM	78 nM	103 Nm	670 nM
YTE	800 nM	6.1 μM	2.8 μM	1.6 μM	140 nM	70 nM	235 nM
FES-YTE	---	---	---	---	---	---	n.d.
FE-YTE	---	---	---	---	---	360 nM	n.d.
FQQ-YTE	---	---	---	---	---	---	n.d.
FAQ-YTE	---	---	---	---	---	---	n.d.
FQG-YTE	---	---	---	---	---	---	n.d.
--- indica la unión a bajo por determinar							

Tabla 9. Unión del receptor FcγR, C1q y FcRn con variantes de Ab4 medido por SPR

Ab4	FcγRIIIa (158V)	FcγRIIIa (158F)	FcγRII a	FcγRII b	FcγRIa	C1q	FcRn
WT	380 nM	1.6 μM	1 μM	2.5 μM	31 nM	250 nM	1070 nM
YTE	820 nM	2.8 μM	1.9 μM	3.6 μM	43 nM	400 nM	270 nM
FES-YTE	---	---	---	---	---	---	270nM
FE-YTE	---	---	---	---	---	*	n.d.
FQQ-YTE	---	---	---	---	---	---	290 nM
FAQ-YTE	---	---	---	---	---	---	n.d.
FQG-YTE	---	---	---	---	---	---	350 nM

--- indica la unión a bajo por determinar

* Indica la unión residual

Los experimentos de unión SPR indicaron de este modo que los anticuerpos que comprenden el dominio Fc de IgG variante con mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE o FQQ-YTE carecían de unión a receptores celulares que se sabe que son esenciales para ADCC y el receptor soluble C1q que puede iniciar CDC.

5 Ejemplo 4

Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Los ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) se realizaron con dominios Fc IgG variante incorporados en el fondo Ab3 (HB20.3 anti-CD20; SEQ ID NO: 5 y 6). Se usó una línea celular asesina natural que expresa CD16 como células efectoras con células Daudi como objetivo. Las células Daudi y efectoras se lavaron en PBS y se diluyeron a una densidad de 800,000c/ml. Se agregaron células Daudi y efectoras a placas blancas de 96 pocillos V-welled (50 µl cada uno). Las variantes de anticuerpos Ab3 a diversas concentraciones se agregaron luego a los pocillos. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 4 horas a 37 °C. La muerte celular de Daudi también se controló mediante el análisis de la liberación de LDH usando el ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 (Promega) según las instrucciones del fabricante.

En experimentos usando una línea celular derivada de células Natural Asesinas (NK) como células efectoras, y células Daudi como dianas, los anticuerpos WT Ab3 y los anticuerpos Ab3 que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones YTE dieron una respuesta de ADCC titulable. Por el contrario, los anticuerpos Ab3 que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones FAQ-YTE, FQQ-YTE o FES-YTE no produjeron citotoxicidad significativa ni siquiera a concentraciones de hasta 300 µg/ml (Figura 3).

20 Ejemplo 5

Ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Los ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se realizaron con dominios variantes Fc de IgG incorporados en Ab3 (HB20.3 anti-CD20; SEQ ID NO: 5 y 6). Se usó suero humano de donantes sanos como fuente de complemento con células Daudi como células efectoras. Las células Daudi se lavaron en PBS y se diluyeron a una densidad de 800,000c/ml. Luego se agregaron las células a una placa de fondo V en blanco (50 µl cada una). Luego se agregó suero diluido (50 µl) a la concentración deseada junto con variantes de anticuerpos a diversas diluciones. Las células se incubaron a 37 °C, durante 4 horas. Luego, se agregó el reactivo azul alamar (Life Technologies) y la muerte celular de Daudi se cuantificó 12 horas después (según las instrucciones del fabricante).

Solo se demostró que los anticuerpos WT Ab3 o los anticuerpos Ab3 con dominios Fc que comprenden mutaciones YTE provocan una citotoxicidad dependiente del complemento robusta. Por el contrario, los anticuerpos Ab3 que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones FAQYTE, FQG-YTE, FQQ-YTE, FES-YTE no lograron provocar citotoxicidad dependiente del complemento (Figura 4).

Ejemplo 6

Estudios de estabilidad acelerada

Las variantes de anticuerpos en el anticuerpo Ab4 (anticuerpo 1B8 anti-C5a; SEQ ID NOS: 7 y 8) de fondo se concentraron a 100 mg/ml en histidina 25 mM pH 6.0. Los anticuerpos se colocaron en viales de vidrio y se almacenaron en una cámara controlada (40 °C, 75% de humedad relativa) durante 6 semanas. Las muestras se analizaron a intervalos semanales para determinar el porcentaje de agregado mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). El análisis HPSEC se realizó en un sistema HPLC Agilent con una columna TSK-Gel G3000 (Agilent Technologies). La proteína eluida se detectó usando absorbancia UV a 280 nm y los resultados se informaron como el porcentaje de área del pico de monómero del producto. Los picos que eluían antes que el monómero, se registraron como porcentaje de agregado y los picos que eluían después del monómero se registraron como porcentaje de fragmento/otro. Las tasas de agregación a lo largo del tiempo se determinaron por regresión lineal.

Se realizaron estudios de estabilidad acelerada para evaluar cualquier mejora en las tasas de agregación/fragmentación para anticuerpos que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE, FQQ-YTE versus anticuerpos que comprenden dominios variantes Fc de IgG con mutaciones FES-YTE (Tabla 10). La variante de anticuerpo FES-YTE (en el fondo Ab4) tuvo una tasa de agregación de 1.93% a 40 °C, durante un mes, mientras que los anticuerpos Ab4 con las mutaciones FQG-YTE y FQQ-YTE mostraron una mejora de 1.01% y 1.1% respectivamente.

5 Los anticuerpos Ab4 con las mutaciones FES-YTE tenían una tasa de pérdida de monómero global del 3.82% por mes, mientras que los anticuerpos Ab4 WT y los anticuerpos Ab4 con mutaciones YTE tenían una tasa de pérdida de monómero general del 2.71% y 2.75% por mes, respectivamente. Los anticuerpos Ab4 con mutaciones FQQ-YTE y FQG-YTE habían mejorado las tasas generales de pérdida de monómero a 40 °C en comparación con los anticuerpos Ab4 con mutaciones FES-YTE de 3.28% y 3.36%. Los anticuerpos Ab4 con mutaciones FAQ-YTE tuvieron una pérdida de monómero/mes mayor a la esperada debido a una mayor tasa de fragmentación (5.74%).

Tabla 10. Estabilidad acelerada y datos de DSC para variantes de anticuerpos Ab4

	WT	YTE	FES-YTE	FQQ-YTE	FQG-YTE	FAQ-YTE
Tm1 °C (DSC)	69.2	62.7	55.6	61.6	60.1	60.6
40 °C % de pérdida de monómero/mes	2.71	2.75	3.82	3.28	3.36	6.43
40 °C % de pérdida de agregado/mes	0.61	0.75	1.93	1.1	1.01	0.69
40 °C % de pérdida de fragmento/mes	2.11	2.04	1.95	2.18	2.36	5.74

Ejemplo 7

10 Geles de enfoque isoeléctrico (IEF)

Los geles de amfolina prefabricados (Amersham Biosciences, Uppsala Suecia; intervalo de pI 3.5-9.5) se cargaron con IgG. Se usaron estándares de marcadores de pI de amplio intervalo (Amersham Biosciences, intervalo de pI 3-10) para determinar el pI relativo para los diversos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La electroforesis se realizó a 1500 V, 50 mA durante 105 min. Los geles se fijaron durante 45 minutos usando una solución de fijación Sigma (Sigma, Saint Louis, MO). La tinción se realizó durante la noche a temperatura ambiente usando la tinción Simply Blue (Invitrogen). El desteñido se realizó con una solución que consistía en 25% de etanol, 8% de ácido acético y 67% de agua purificada.

15 El análisis por gel IEF mostró que la introducción de mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE y FQQ-YTE en los dominios Fc de los anticuerpos Ab4 (anticuerpo anti-C5a 1B8; SEQ ID NOS: 7 y 8) tuvo un mínimo efecto en pI con todas las construcciones cerca de un pI de > 8.3 (Figura 5).

Ejemplo 8

Solubilidad aparente por precipitación de polietilenglicol (PEG)

25 Los ensayos de precipitación de PEG se llevaron a cabo de manera similar a Gibson et al., J. Pharm. Sci. 100: 1009-1021 (2011). Se usó la adición de cantidades crecientes de PEG 6000 para precipitar el anticuerpo. Se prepararon soluciones de PEG 6000 que variaban de 0% a 40% [p/v] de PEG en solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2. Estas soluciones se agregaron a los pocillos de una placa de filtro de poliestireno blanca de 96 pocillos. Luego se agregaron anticuerpos a los pocillos con niveles variables de PEG a una concentración final de proteína de 1 mg/mL. La(s) placa(s) de 96 pocillos se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Luego las placas se centrifugaron y el filtrado se recogió en una placa de recogida de poliestireno transparente de 96 pocillos. Después de transferir volúmenes iguales de cada filtrado de muestra a una placa de 96 pocillos de poliestireno transparente y fresca, se analizó la concentración de proteína en el filtrado midiendo la absorbancia a 280 nm con un nanodrop. La solubilidad aparente se calcula usando la pendiente de la transición de agregación.

30 Los anticuerpos Ab4 (anticuerpo anti-C5a 1B8; SEQ ID NOS: 7 y 8) que comprenden dominios Fc variantes con mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE y FQQ-YTE se evaluaron para determinar la solubilidad aparente mejorada evaluada mediante precipitación con PEG (Tabla 11) La extrapolación de la transición de agregación puede dar una medida de "solubilidad aparente". Este valor es útil solo para clasificar variantes de anticuerpos, ya que los valores absolutos no indican límites de solubilidad reales (por ejemplo, los valores para proteínas altamente solubles están sobreestimados).

35 Los anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc variantes con mutaciones FES-YTE dieron el resultado de solubilidad aparente más pobre de todos los anticuerpos probados a <10 mg/ml. Los anticuerpos Ab4 que comprenden dominios Fc variantes con FAQ-YTE, FQG-YTE, FQQ-YTE tuvieron puntajes de solubilidad aparente altos > 100 mg/ml, lo que indica propiedades de solubilidad mejoradas sobre FES-YTE.

Tabla 11. Clasificación de solubilidad aparente de anticuerpos Ab4 que comprenden dominios variantes Fc de IgG

Ab4	Solubilidad aparente mg/ml	Rango
WT	> 100	1
FQQ-YTE	> 100	1
YTE	> 100	2
FQG-YTE	> 100	2
FAQ-YTE	> 100	3
FES-YTE	< 10	4

Ejemplo 9

Dispersión dinámica de luz (DLS)

- 5 La distribución del tamaño de la proteína y el tamaño molecular se monitorizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, PA). La muestra (en 1 mg/ml en histidina 25 mM -HCl pH 6) se iluminó con un láser de 633 nm, y la intensidad de la luz dispersa se midió en un ángulo de 173 grados. Las muestras analizadas a temperatura ambiente se incubaron en la mesa de laboratorio durante aproximadamente 90 minutos antes del muestreo. Antes de cada análisis de muestra, se introdujeron factores de corrección para parámetros tales como viscosidad, índice de refracción y absorbancia.

- 10 Variantes del anticuerpo Ab4 (anticuerpo anti-C5a 1B8; SEQ ID NOS: 7 y 8) que comprenden mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE, FQQ-YTE en sus respectivos dominios Fc, así como Ab4 de tipo salvaje y variantes que comprenden mutaciones FES-YTE e YTE en sus respectivos dominios Fc se encontró que todas eran monodispersas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (Tabla 12). De este modo, la introducción de las combinaciones de mutaciones FAQ-YTE, FQG-YTE, FQQ-YTE en el dominio Fc de los anticuerpos Ab4 no causó un aumento de la polidispersidad.

Tabla 12. Evaluación de la polidispersidad de anticuerpos por dispersión dinámica de luz (DLS)

Variante	Tamaño hidrodinámico (d. nm)	Polidispersidad
WT	10.80	0.02
YTE	11.06	0.04
FES-YTE	10.84	0.02
FAQ-YTE	10.84	0.03
FQG-YTE	11.06	0.04
FQQ-YTE	11.04	0.03

- 20 La descripción anterior de los aspectos específicos revelará tan completamente la naturaleza general de la divulgación que otros pueden, aplicando el conocimiento dentro de la habilidad de la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales aspectos específicos, sin experimentación indebida, sin apartarse de los conceptos generales proporcionados. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones están destinadas a estar dentro del significado y el intervalo de equivalentes de los aspectos divulgados, en base a la enseñanza y orientación presentada en este documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología en este documento
- 25 tiene el propósito de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o fraseología de la presente especificación debe ser interpretada por el experto en el arte a la luz de las enseñanzas y orientación.

La amplitud y el alcance de la presente divulgación no deberían estar limitados por ninguno de los aspectos de ejemplo descritos anteriormente, sino que deberían definirse solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

Secuencias

>SEQ ID NO:1 IGG1 Cadena pesada

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:2 IGG2 Cadena pesada

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKVEPKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

>SEQ ID NO:3 IGG3 Cadena pesada

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:4 IGG4 Cadena pesada

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHKPSNTKVDKKEPKYGPCCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

10 >SEQ ID NO:5 HB20.3 Cadena ligera (Kappa)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPS
RFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSTPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>SEQ ID NO:6 HB20.3 Cadena pesada (Región variable subrayada)

QVQLQOPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTNYNMHWLQKTPGQGLEWIGAIYPENGDTSY
NQKFKGKATLTADKASSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARFYYSYGGAMDYWGQTSVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 746 103 T3

>SEQ ID NO:7 1B8 Cadena ligera (Lambda)

QSALTQPPSASGTPGQRVTI SCSGTNSNIGSNYVFWYQQLPGTAPKLLIFESNRRPSGVP
DRFSGSKSDTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDDTLIAPVFGSGTKVTVLGQPKANPTVT
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

>SEQ ID NO:8 1B8 Cadena pesada (Región variable subrayada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMNWVRQAPGKGLEWVSSISPSGGRTWY

ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARSDGSAAGFLGYWGQGLVTVSS
ASTKGPSVFLPASPSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 >SEQ ID NO:9 IgG1 FQG (posiciones mutadas en cajas)

PAPF**FQ**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:10 IgG1 FQG (posiciones mutadas en cajas)

PAPF**FQ**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:11 IgG1 FAQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPF**FA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>SEQ ID NO:12 IgG1 FQG-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPF**FQ**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:13 IgG1 FQG-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPF**FQ**GGPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 >SEQ ID NO:14 IgG1 FAQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPPEFAAGGPSVFLFPPKPKDTL^YI^TREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK^QVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTTLP
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTV
VDKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:15 IgG2 FQQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FQ}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^QVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
KSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:16 IgG2 FQG (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FQ}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^VSNKGLPA^GIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
KSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

>SEQ ID NO:17 IgG2 FAQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FA}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^QVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
KSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:18 IgG2 FQQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FQ}GPSVFLFPPKPKDTL^YI^TREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^QVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

>SEQ ID NO:19 IgG2 FQG-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FQ}GPSVFLFPPKPKDTL^YI^TREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^VSNKGLPA^GIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:20 IgG2 FAQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPP^{FA}GPSVFLFPPKPKDTL^YI^TREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^QVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 >SEQ ID NO:21 IgG3 FQQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPPE^{FQ}GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTFRVVS^VLT^VLH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^QVSNKALPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTTLP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSGFFLYSKLTV
DKSRWQQGN^IFSCSV^MHEALHN^RFTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:22 IgG3 FQG (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FQ]GGPSVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAG[Q]IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:23 IgG3 FAQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FA]GGPSVFLFPPKPKDTLMI[S]RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[Q]VSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK

5 >SEQ ID NO:24 IgG3 FQQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FQ]GGPSVFLFPPKPKDTL[Y]I[T]R[E]PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[Q]VSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:25 IgG3 FQG-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FQ]GGPSVFLFPPKPKDTL[Y]I[T]R[E]PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAG[Q]IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:26 IgG3 FAQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FA]GGPSVFLFPPKPKDTL[Y]I[T]R[E]PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[Q]VSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK

10

>SEQ ID NO:27 IgG4 FQQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FQ]GGPSVFLFPPKPKDTL[M]I[S]R[T]PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK[Q]VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

>SEQ ID NO:28 IgG4 FQG (posiciones mutadas en cajas)

PAPF[FQ]GGPSVFLFPPKPKDTL[M]I[S]R[T]PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS[Q]IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
 QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

15 >SEQ ID NO:29 IgG4 FAQ (posiciones mutadas en cajas)

PAPFAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:30 IgG4 FQQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPFFQGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:31 IgG4 FQG-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPFFQGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

>SEQ ID NO:32 IgG4 FAQ-YTE (posiciones mutadas en cajas)

PAPFAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:33 Motavizumab (ab1) Cadena pesada (VH está subrayada; wt región Fc)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTPGMSVGVIRQPPGKALEWLADIWDDKKHYNP
SLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARAMIFNFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KLSLSLSPGK

10 >SEQ ID NO:34 Motavizumab (ab1) Cadena ligera (VL está subrayada)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTVTCRASQRISTYLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLQSGVPSRFS
GSQSGTDFTLTISLQPDFFATYYCQESYNTPRFTFGQGTKVEIRRTVAAPSVAIFPPSDEQLK
SGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSKADYEK
HVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

>SEQ ID NO:35 Anti IL4R (ab2) Cadena pesada (VH está subrayada; wt región Fc)

ES 2 746 103 T3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQK
FQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGKYWYDWGKGLVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
PEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

GK

>SEQ ID NO:36 Anti IL4R (ab2) Cadena ligera (VL está subrayada)

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSIGNSYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRF
SGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDTSVWVEWPFGTGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS
SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Lista de secuencias

- 5 <110> MedImmune LLC
- <120> Moléculas con función efectora reducida y semividas prolongadas, composiciones y usos de las mismas.
- <130> AEFC-120WO1
- <150> 61640,327
- <151> 2012-04-30
- 10 <160> 40
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 330
- <212> PRT
- 15 <213> homo sapiens
- <400> 1

ES 2 746 103 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

ES 2 746 103 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 746 103 T3

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 Pro 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

Ser 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

ES 2 746 103 T3

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> 3

<211> 377

<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 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

ES 2 746 103 T3

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
 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> 4

<211> 327

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 4

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

ES 2 746 103 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

ES 2 746 103 T3

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 5

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

ES 2 746 103 T3

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> 6

<211> 452

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

ES 2 746 103 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 746 103 T3

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 7

<211> 215

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 7

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Tyr Val Phe Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Phe Glu Ser Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Thr Leu
 85 90 95

Ile Ala Pro Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

ES 2 746 103 T3

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys
210 215

<210> 8

<211> 450

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu 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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

ES 2 746 103 T3

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

ES 2 746 103 T3

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

Gly Lys
450

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 9

ES 2 746 103 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

ES 2 746 103 T3

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 11

<211> 218

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 746 103 T3

<223> construcción sintética

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

5 <210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 746 103 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130          135          140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210          215

```

5

<210> 13

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 746 103 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 13

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210         215

```

5 <210> 14

<211> 218

<212> PRT

ES 2 746 103 T3

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 14

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210         215

```

5

<210> 15

<211> 217

<212> PRT

ES 2 746 103 T3

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

5

<210> 16

<211> 217

ES 2 746 103 T3

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 16

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130          135          140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210          215

```

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 17

ES 2 746 103 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 18

<211> 217

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

ES 2 746 103 T3

<223> construcción sintética

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 19

5 <211> 217

<212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 746 103 T3

<223> construcción sintética

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 20

5 <211> 217

<212> PRT

<213> artificial

<220>

ES 2 746 103 T3

<223> construcción sintética

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 21

5 <211> 218

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 746 103 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 21

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130        135        140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195        200        205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210        215

```

5 <210> 22

<211> 218

<212> PRT

ES 2 746 103 T3

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 22

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195         200         205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210         215

```

5

<210> 23

<211> 218

ES 2 746 103 T3

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 23

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130         135         140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 195         200         205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210         215
    
```

<210> 24

ES 2 746 103 T3

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 24

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195         200         205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210         215

```

<210> 25

<211> 218

ES 2 746 103 T3

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 25

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130                   135                   140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 195                   200                   205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210                   215
    
```

<210> 26

<211> 218

10 <212> PRT

ES 2 746 103 T3

<213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 26

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130        135        140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195        200        205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210        215

```

5

<210> 27

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 27

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210         215
    
```

ES 2 746 103 T3

<210> 28

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 28

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210         215
    
```

ES 2 746 103 T3

<210> 29

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 29

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210         215
    
```

ES 2 746 103 T3

<210> 30

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 30

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210         215

```


ES 2 746 103 T3

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 31

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210         215

```

<210> 32

ES 2 746 103 T3

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 32

```

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
35          40          45

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
180         185         190

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210         215

```

ES 2 746 103 T3

<210> 33

<211> 450

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> construcción sintética

<400> 33

```

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
          20          25          30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60

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

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85          90          95
    
```

ES 2 746 103 T3

Cys Ala Arg Ala Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 245 250 255
 Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

ES 2 746 103 T3

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 Val
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 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 34

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

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

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

Ser Gly Ala Ser Ser 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

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

ES 2 746 103 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg 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> 35

<211> 443

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 35

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 Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 746 103 T3

				85						90					95			
Ala	Arg	Gly	Lys	Tyr	Trp	Met	Tyr	Asp	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Leu	Val			
			100					105					110					
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala			
		115					120					125						
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu			
		130					135				140							
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly			
145					150					155					160			
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser			
				165					170					175				
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu			
			180					185					190					
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr			
		195					200					205						
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro			
		210				215					220							
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro			
225				230						235				240				
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr			
				245					250					255				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn			
			260					265					270					
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg			
		275					280					285						
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val			
		290				295					300							
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser			
305					310					315					320			
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys			
				325					330					335				

ES 2 746 103 T3

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

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

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

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 36

<211> 217

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 36

ES 2 746 103 T3

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ile Gly Asn Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Thr Ser Pro
 85 90 95

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

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 37

<211> 218

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

- <223> construcción sintética
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (5)..(5)
- 5 <223> Xaa es Leu o Phe
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (6)..(6)
<223> Xaa se selecciona de Leu, Ala, Asn, Phe, Gln y Val
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (23)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 15 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (25)..(25)
<223> Xaa es Met o Tyr
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 20 <222> (27)..(27)
<223> Xaa es Ser o Thr
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (29).. (29)
- 25 <223> Xaa es Thr o Glu
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (93)..(93)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (102)..(102)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
- 35 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (112)..(112)

ES 2 746 103 T3

<223> Xaa se selecciona de Lys, Ala, Asp, Glu, His, Asn y Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (122)..(122)

5 <223> Xaa se selecciona de Pro, Ala y Gly

<400> 37

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130         135         140

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210         215

```

<210> 38

- <211> 217
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
- 5 <223> construcción sintética
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Val o Phe
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de Ala, Asn, Phe, Gln y Val
 <220>
- 15 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 20 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Met o Tyr
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (26)..(26)
- 25 <223> Xaa es Ser o Thr
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Thr o Glu
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (92)..(92)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- 35 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (101)..(101)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (111)..(112)

5 <223> Xaa se selecciona de Lys, Ala, Asp, Glu, His, Asn y Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (121)..(121)

<223> Xaa se selecciona de Pro, Ala y Gly

10 <400> 38

ES 2 746 103 T3

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Ala Xaa Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 39

<211> 218

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> construcción sintética

- <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Leu o Phe
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de Leu, Ala, Asn, Phe, Gln y Val
 <220>
- 10 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 15 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa es Met o Tyr
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (27)..(27)
- 20 <223> Xaa es Ser o Thr
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr o Glu
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (102)..(102)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 35 <222> (112)..(112)
 <223> Xaa se selecciona de Lys, Ala, Asp, Glu, His, Asn y Gln

ES 2 746 103 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (122)..(122)

<223> Xaa se selecciona de ausente (sin residuo de aminoácido), Ala y Gly

5 <400> 39

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130         135         140

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

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

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

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 195         200         205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210         215

```

<210> 40

<211> 218

- <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Phe
 <220>
- 10 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de Leu, Ala, Asn, Phe, Gln y Val
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 15 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (25)..(25)
- 20 <223> Xaa es Met o Tyr
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Ser o Thr
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr o Glu
 <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- 35 <222> (102)..(102)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (112)..(112)

<223> Xaa se selecciona de Lys, Ala, Asp, Glu, His, Asn y Gln

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (122)..(122)

<223> Xaa se selecciona de Ser, Ala y Gly

<400> 40

ES 2 746 103 T3

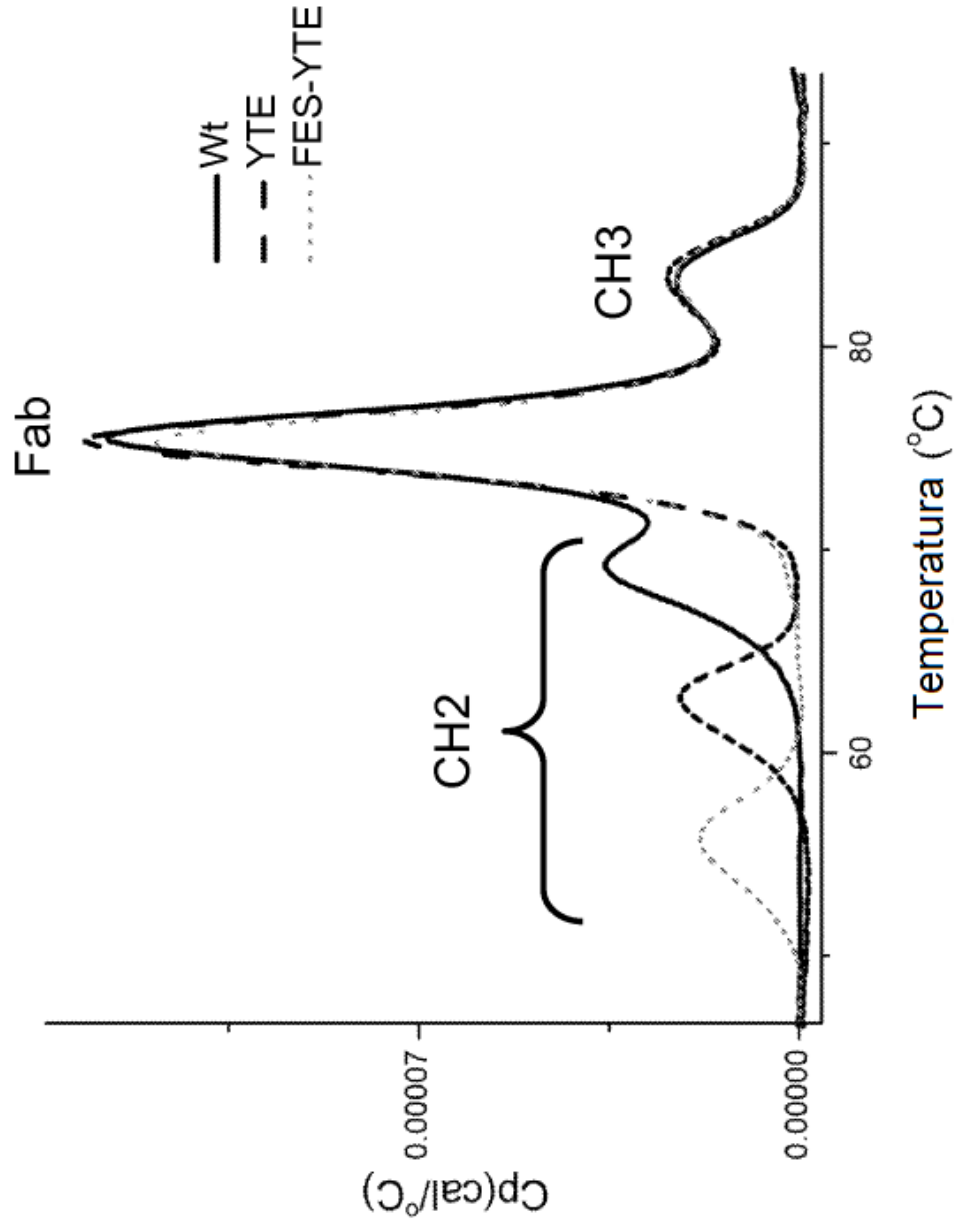
Pro Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60
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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende un dominio Fc de IgG variante humano, en el que el dominio Fc de IgG variante humano se selecciona del grupo que consiste en
- 5 (a) un dominio Fc de IgG variante que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322,
- (b) un dominio Fc de IgG variante que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235; y un aminoácido glicina (G) en la posición 331, y
- (c) un dominio Fc de IgG variante que comprende un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234; un aminoácido alanina (A) en la posición 235; y un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322,
- 10 y que comprende además
- (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252; y
- (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y
- (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256,
- en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.
- 15 2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234;
- (b) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235;
- (c) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322;
- (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252;
- 20 (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y,
- (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256,
- en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234;
- 25 (b) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 235;
- (c) un aminoácido glicina (G) en la posición 331;
- (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252;
- (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y,
- (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256,
- 30 en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) un aminoácido fenilalanina (F) en la posición 234;
- (b) un aminoácido alanina (A) en la posición 235;
- (c) un aminoácido glutamina (Q) en la posición 322;
- 35 (d) un aminoácido tirosina (Y) en la posición 252;
- (e) un aminoácido treonina (T) en la posición 254; y,
- (f) un aminoácido del ácido glutámico (E) en la posición 256,
- en el que la numeración de aminoácidos está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que el polipéptido tiene una semivida mejorada en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 o 5, en el que el polipéptido ha mejorado la unión de FcRn en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
- 5 7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido comprende además un dominio de unión a antígeno, tal como, un dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido tiene una función efectora mediada por Fc reducida en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
- 10 9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-8, en el que el polipéptido tiene menor afinidad por un receptor gamma Fc (FcγR) en comparación con el mismo polipéptido que comprende un dominio Fc de tipo salvaje.
10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que el polipéptido tiene una mayor afinidad por FcRn a pH 6.0 que a pH 7.4.
- 15 11. Un conjugado que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y una unidad estructural terapéutica.
12. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un conjugado según la reivindicación 11 para uso en la terapia de un mamífero.
- 20 13. Un método para disminuir la función efectora inducida por Fc en un polipéptido original que comprende un dominio Fc que comprende:
- (a) sustitución del aminoácido en la posición 234 en el dominio Fc con fenilalanina (F);
- (b) sustitución del aminoácido en la posición 235 en el dominio Fc con alanina (A) o glutamina (Q); y,
- (c) sustitución del aminoácido en la posición 322 del dominio Fc con glutamina (Q); o
- 25 sustitución del aminoácido en la posición 331 del dominio Fc con glicina (G); en el que el dominio Fc del polipéptido original comprende además una tirosina (Y) en la posición 252, una treonina (T) en la posición 254 y un ácido glutámico (E) en la posición 256, para producir un polipéptido según la reivindicación 1, en el que la numeración de aminoácidos del dominio Fc está de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

Ab4



Temperatura (°C)

Fig. 1

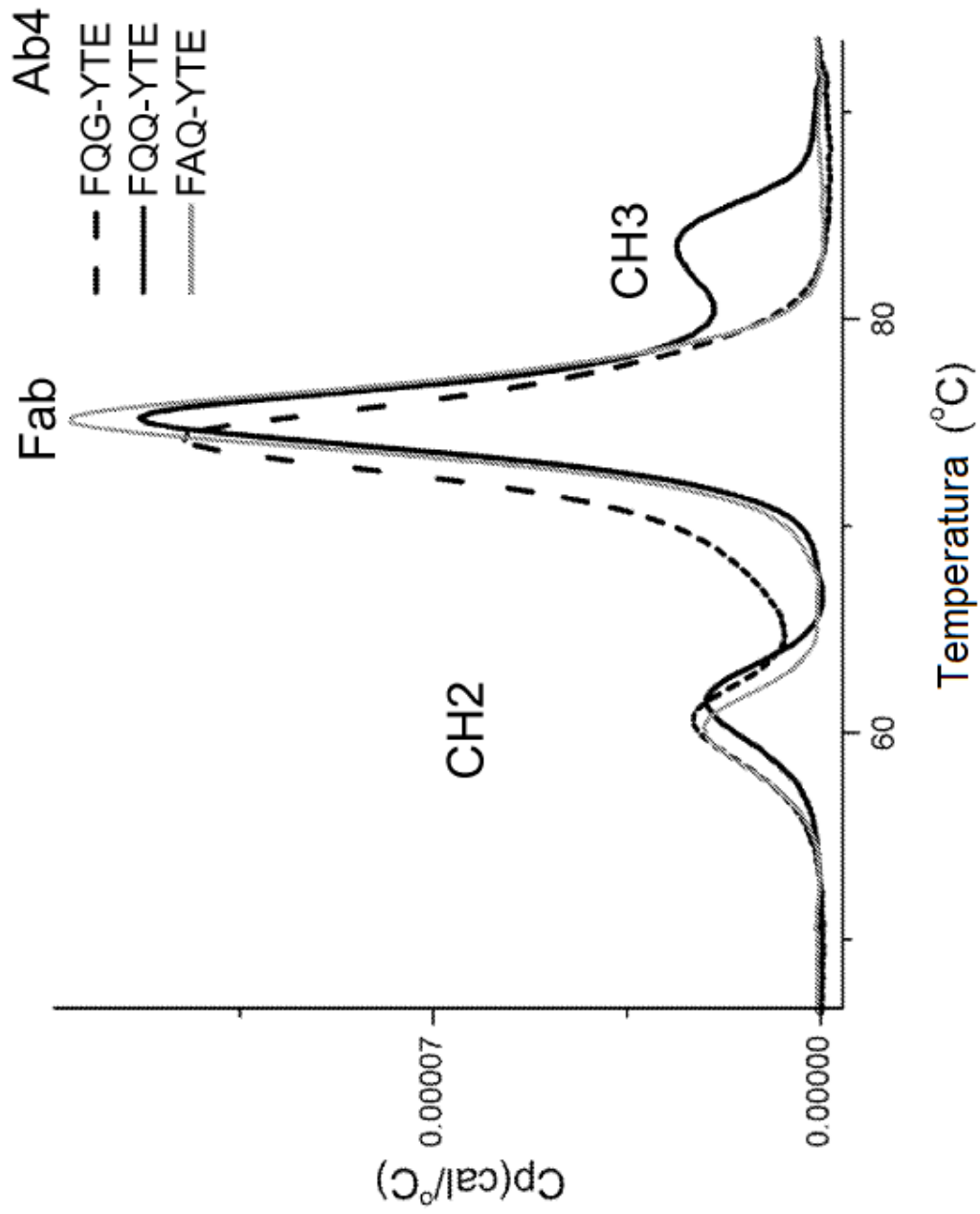


Fig. 2

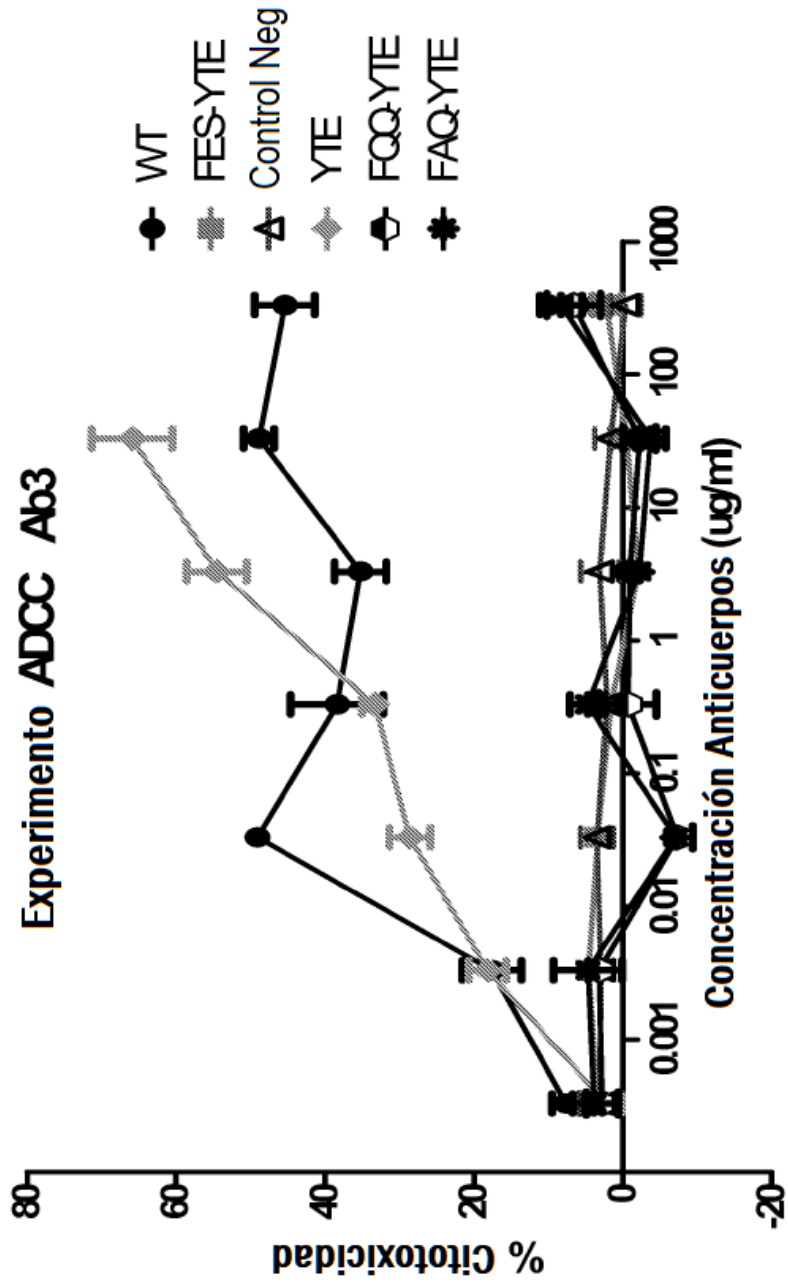


Fig. 3

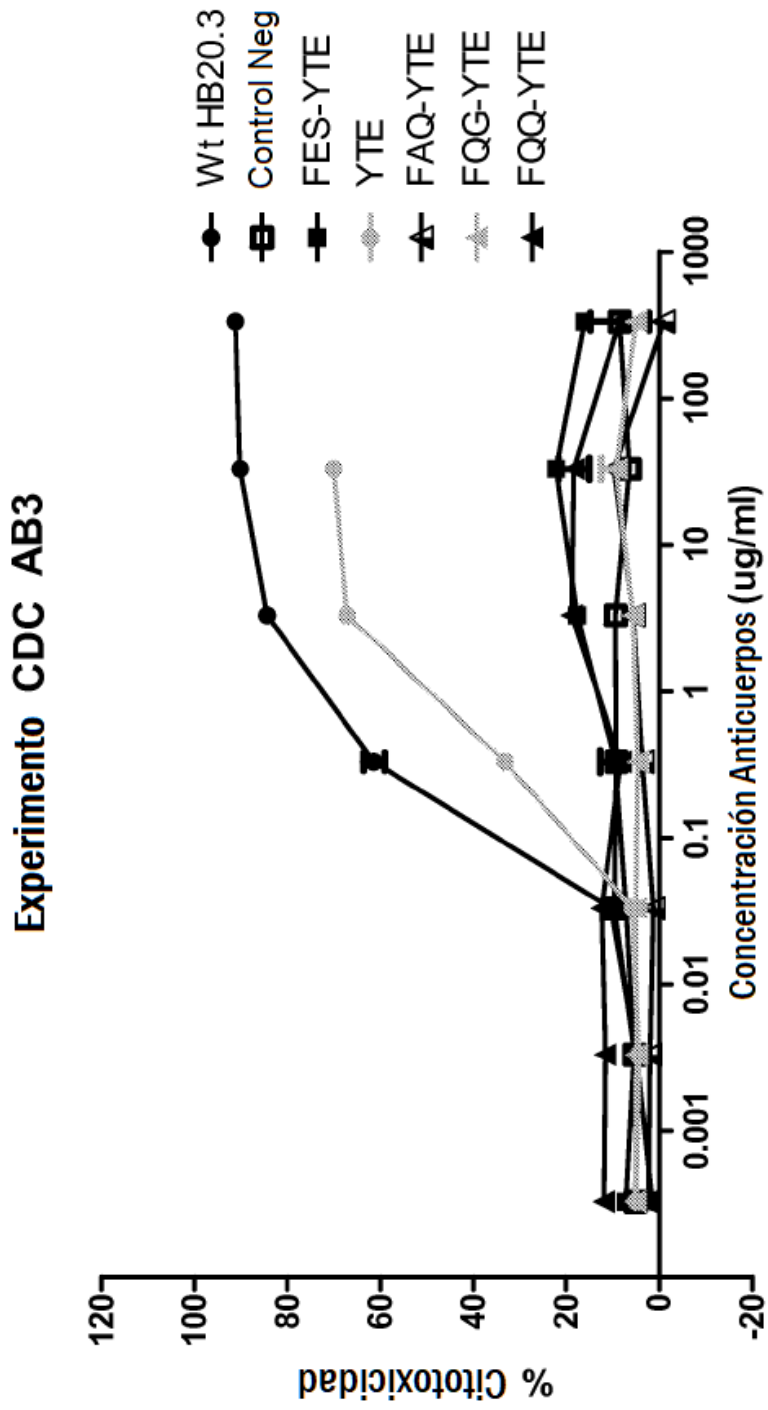


Fig. 4

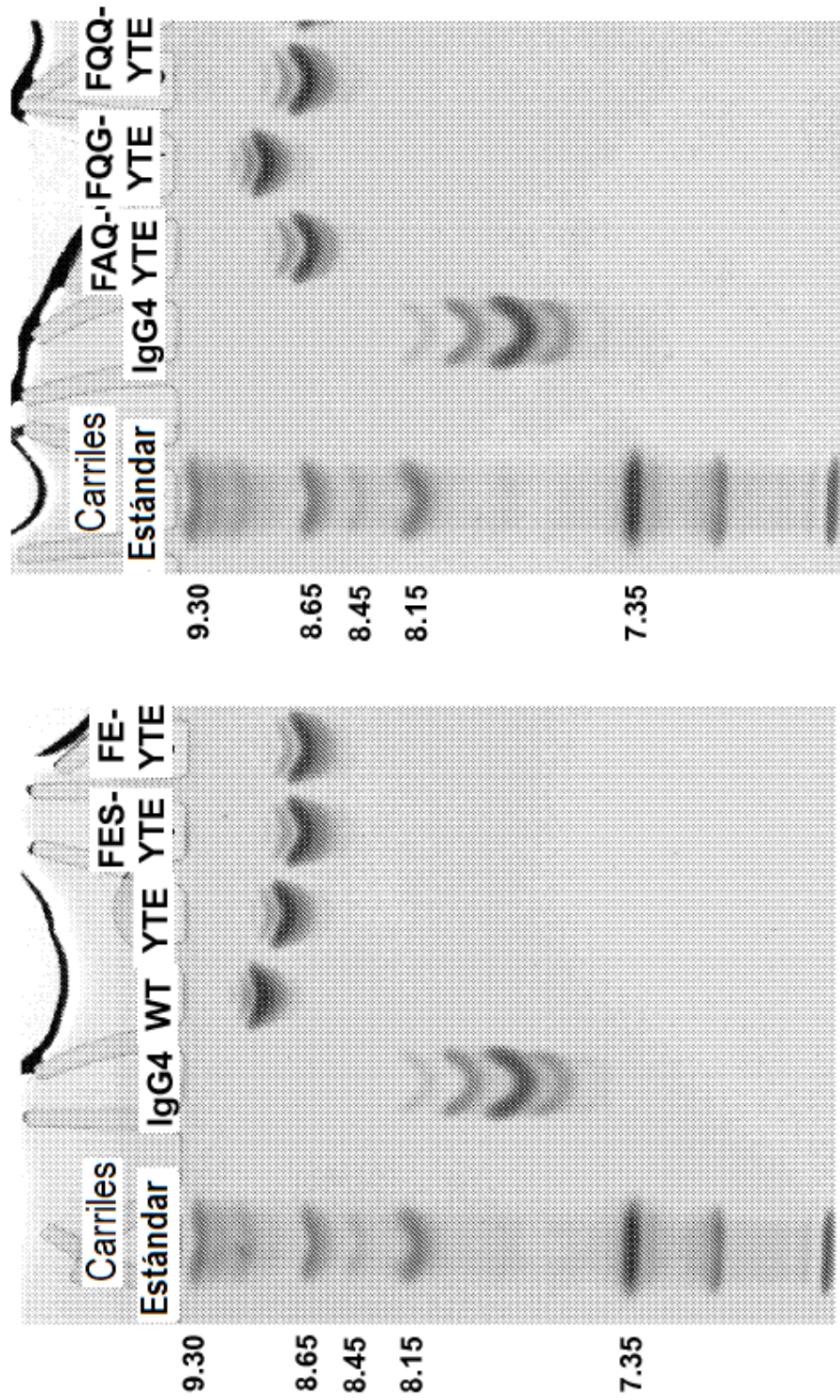


Fig. 5