

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 383**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2015 PCT/EP2015/075656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2015 E 15790922 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3215528**

54 Título: **Variantes de la región Fc con unión al FcRn modificada y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**06.11.2014 EP 14192052**

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

**20.03.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MOESSNER, EKKEHARD y  
SCHLOTHAUER, TILMAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 749 383 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de la región Fc con unión al FcRn modificada y procedimientos de uso

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos y polipéptidos de fusión de la región Fc que se modifican asimétricamente con respecto a su receptor Fc, especialmente su FcRn, la interacción y procedimientos de uso de los mismos.

10

**ANTECEDENTES**

El receptor Fc neonatal (FcRn) es importante para el destino metabólico de los anticuerpos de la clase IgG *in vivo*. El FcRn funciona rescatando a la IgG de la vía de degradación lisosómica, dando como resultado una depuración reducida y una semivida incrementada. Es una proteína heterodimérica que consiste en dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I de 50 kDa ( $\alpha$ -FcRn) y una microglobulina  $\beta$ 2 ( $\beta$ 2m) de 15 kDa. El FcRn se une con afinidad alta a la parte CH2-CH3 de la región Fc de un anticuerpo de la clase IgG. La interacción entre un anticuerpo de la clase IgG y el FcRn depende del pH y se produce en una estequiometría 1:2, es decir, una molécula de anticuerpo IgG puede interactuar con dos moléculas de FcRn por medio de sus dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada (véase, por ejemplo, Huber, A.H., *et al.*, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083).

20

Por tanto, las propiedades/características de la unión al FcRn *in vitro* de las IgG son indicativas de sus propiedades farmacocinéticas *in vivo* en la circulación sanguínea.

25 En la interacción entre el FcRn y la región Fc de un anticuerpo de la clase IgG participan diferentes residuos de aminoácidos del dominio CH2 y CH3 de cadena pesada.

Se conocen diferentes mutaciones que influyen en la unión al FcRn y, con ello, en la semivida en la circulación sanguínea. Se han identificado residuos de la región Fc críticos para la interacción región Fc de ratón-FcRn de ratón mediante mutagénesis dirigida por sitio (véase, por ejemplo, Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180). Los residuos I253, H310, H433, N434 y H435 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat) están implicados en la interacción (Medesan, C., *et al.*, Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533-2536; Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542-548). Se descubrió que los residuos I253, H310 y H435 eran críticos para la interacción de la región Fc humana con FcRn murino (Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2885).

30

35

Se han realizado procedimientos para incrementar la unión de la región Fc (y también la IgG) a FcRn mediante la mutación de diversos residuos de aminoácidos en la región Fc: Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 y Asn 434 (véase Kuo, T.T., *et al.*, J. Clin. Immunol. 30 (2010) 777-789; Ropeenian, D.C., *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725).

40

La combinación de las mutaciones M252Y, S254T, T256E se ha descrito por Dall'Acqua *et al.* para mejorar la unión al FcRn mediante estudios de interacción proteína-proteína (Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524). Los estudios del complejo región Fc humana-FcRn humano han demostrado que los residuos I253, S254, H435 e Y436 son cruciales para la interacción (Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). En Yeung, Y.A., *et al.* (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) se ha informado de y examinado diversos mutantes de los residuos 248 a 259 y 301 a 317 y 376 a 382 y 424 a 437.

45

Yeung, Y.A., *et al.* (Cancer Res. 70 (2010) 3269-3277) describieron un anticuerpo terapéutico anti-VEGF con potencia incrementada independiente de la semivida farmacocinética con mutaciones seleccionadas del grupo N434A, T307Q/N434A, T307Q/N434S, V308P/N434A y T307Q/E380A/N434A (IgG1 humana). La farmacocinética mediada por el receptor FcRn de la IgG terapéutica en el ojo se describe por Kim, H., *et al.*, (Mol. Vis. 15 (2009) 2803-2812). El documento WO 2014/006217 describió proteínas diméricas que comprenden aminoácidos en tres posiciones diferentes que son diferentes de las presentes en una IgG1 humana, de las cuales seis pueden formar una estructura hexamérica en solución. Las proteínas que contienen Fc que comprenden una región de unión y una región Fc variante que pueden provocar una o más funciones efectoras inmunitarias y/o que se pueden unir a un receptor de Fc más eficazmente que una proteína similar que contiene Fc que comprende una región Fc natural se describen en el documento WO 2012/125850. El documento WO 210/151792 describió un formato de anticuerpo biespecífico que proporciona facilidad de aislamiento, que comprende dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina que se modifican diferencialmente en el dominio CH3, en el que las modificaciones diferenciales son no inmunogénicas o sustancialmente no inmunogénicas con respecto a las modificaciones de CH3, y al menos una de las modificaciones da como resultado una afinidad diferencial por el anticuerpo biespecífico para un reactivo de afinidad tal como la proteína A, y el anticuerpo biespecífico se puede aislar de una célula alterada, de un medio o de una mezcla de anticuerpos en base a su afinidad por la proteína A. Las composiciones de inmunoglobulina que simultáneamente coacoplan antígenos, donde uno de los antígenos está unido bivalentemente y el otro antígeno está unido monovalentemente, se describen en el documento WO 2011/028952.

50

55

60

65

**SUMARIO**

La invención se define en las reivindicaciones.

Se ha descubierto que la unión a FcRn de un anticuerpo o polipéptido de fusión de la región Fc se puede modificar alterando residuos de aminoácidos en posiciones no correspondientes en los polipéptidos de la región Fc individuales, ya que estas alteraciones actúan conjuntamente en la modificación de la unión a FcRn. Los anticuerpos y los polipéptidos de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades en las que se requieren tiempos de retención sistémica adaptados individualmente.

En el presente documento, se informa de regiones Fc variantes que tienen propiedades de unión a FcRn modificadas en comparación con una región Fc natural correspondiente. Estas regiones Fc variantes contienen mutaciones aminoacídicas específicas en el dominio CH2 y/o CH3. Se ha descubierto que estas mutaciones, cuando se usan solas o bien en combinación en la misma cadena pesada o distribuidas en ambas cadenas pesadas de una región Fc, permiten diseñar a medida la semivida *in vivo* de la región Fc variante.

En el presente documento se informa de una región Fc de la clase IgG (humana) variante que comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc,

en la que

a) el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc se derivan del mismo polipéptido de la región Fc de la clase IgG (humana) original, y

b) el primer polipéptido de la región Fc tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc en al menos una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat,

con lo que la región Fc de la clase IgG (humana) variante tiene una afinidad diferente por un receptor Fc humano en comparación con una región Fc de la clase IgG (humana) que tiene los mismos residuos de aminoácidos (que el polipéptido de la región Fc humana (original) de a)) en posiciones correspondientes de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat en el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc.

En el presente documento se informa de una región Fc de la clase IgG (humana) variante que comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc,

en la que

a) el primer polipéptido de la región Fc tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc en al menos una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat,

con lo que la región Fc de la clase IgG (humana) variante tiene una afinidad diferente por un receptor Fc humano en comparación con una región Fc de la clase IgG que tiene el mismo residuo de aminoácido (que en una región Fc humana correspondiente) en el primer y el segundo polipéptido de la región Fc en la posición correspondiente.

En el presente documento se informa de una región Fc de la clase IgG (humana) variante que comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc,

en la que

a) la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de la región Fc difiere de la secuencia de aminoácidos de un primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original en uno o más residuos de aminoácidos,

y

la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc difiere de la secuencia de aminoácidos de un segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original en uno o más residuos de aminoácidos, y

b) el primer polipéptido de la región Fc tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc en al menos una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat,

con lo que la región Fc de la clase IgG (humana) variante tiene una afinidad diferente por un receptor Fc humano en comparación con una región Fc de la clase IgG original que comprende el primer y el segundo polipéptido de la región

Fc de la clase IgG original de a).

En el presente documento se informa de una región Fc de la clase IgG (humana) variante que comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc,

en la que

a) la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de la región Fc se deriva de un primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc se deriva de un segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y

b) en el primer polipéptido de la región Fc y/o en el segundo polipéptido de la región Fc se introducen una o más mutaciones, de modo que el primer polipéptido de la región Fc tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc al menos en una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat,

con lo que la región Fc de la clase IgG (humana) variante tiene una afinidad diferente por un receptor Fc humano en comparación con una región Fc de la clase IgG que comprende el primer y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a).

Un aspecto de la invención es una región Fc de la clase IgG que comprende un primer polipéptido de la región Fc variante y un segundo polipéptido de la región Fc variante,

en la que

a) el primer polipéptido de la región Fc variante se deriva de un primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y el segundo polipéptido de la región Fc variante se deriva de un segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, con lo que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es idéntico al o diferente del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y

b) el primer polipéptido de la región Fc variante difiere del segundo polipéptido de la región Fc variante en uno o más residuos de aminoácidos distintos de aquellos residuos de aminoácidos en los que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original difiere del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y

c) la región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc variante y el segundo polipéptido de la región Fc variante tiene una afinidad por un receptor Fc humano que es diferente de la de una región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a) y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a),

en la que el primer polipéptido de la región Fc o bien el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden independientemente entre sí la siguiente combinación de mutaciones:

- T307H y N434H.

En un modo de realización de todos los aspectos, la región Fc de la clase IgG es una región Fc heterodimérica de la clase IgG (humana) variante.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original son polipéptidos de la región Fc de la clase IgG no humana.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original son el mismo polipéptido de la región Fc de la clase IgG.

En un modo de realización de todos los aspectos, el emparejamiento del primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc para formar una región Fc dimérica (funcional) da como resultado la formación de un heterodímero.

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer y el segundo polipéptido de la región Fc difieren independientemente entre sí en al menos un residuo de aminoácido del polipéptido de la región Fc de la clase IgG original respectivo.

En un modo de realización de todos los aspectos, la clase IgG se selecciona de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En un modo de realización de todos los aspectos, el receptor Fc humano se selecciona del receptor Fc neonatal humano y el receptor Fcγ humano.

## ES 2 749 383 T3

En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido de la región Fc difiere en 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 u 11 o 12 residuos de aminoácidos en la posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat del segundo polipéptido de la región Fc.

5 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el primer polipéptido de la región Fc o bien el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- 10 - T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
- T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E, o  
- T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E.

15 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento el primer polipéptido de la región Fc comprende independientemente del segundo polipéptido de la región Fc una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- 20 - T307H y N434H, o  
- T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
- T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E,

25 y

el segundo polipéptido de la región Fc comprende independientemente del primer polipéptido de la región Fc una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones

- 30 - T307H, o  
- T307Q, o  
35 - Q311H, o  
- E430 H, o  
- N434H, o  
40 - T307H y Q311H, o  
- T307H y E430H, o  
45 - T307H y N434A, o  
- T307H y N434H, o  
50 - T307Q y Q311H, o  
- T307Q y E430H, o  
- T307Q y N434H, o  
55 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o  
- T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
- T307H y Q311H y E430H y N434Y, o  
60 - T307Q y Q311H y E430H y N434A, o  
- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o  
65 - T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o

- T307Q y V308P y N434Y e Y436H, o

- T307H y M252Y y S254T y T256E, o

5 - Q311H y M252Y y S254T y T256E, o

- E430 H y M252Y y S254T y T256E, o

- N434H y M252Y y S254T y T256E.

10

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento

el primer polipéptido de la región Fc comprende independientemente del segundo polipéptido de la región Fc una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

15

- T307H y N434H, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H, o

20 - T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E,

y

el segundo polipéptido de la región Fc comprende independientemente del primer polipéptido de la región Fc una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones

25

- T307H, o

- T307Q, o

30

- E430 H, o

- T307H y Q311H, o

35

- T307H y E430H, o

- T307H y N434A, o

- T307H y N434H, o

40

- T307Q y Q311H, o

- T307Q y E430H, o

45

- T307Q y N434H, o

- T307H y Q311H y E430H y N434A, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H, o

50

- T307H y Q311H y E430H y N434Y, o

- T307Q y Q311H y E430H y N434A, o

55

- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o

- T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o

- T307Q y V308P y N434Y e Y436H, o

60

- T307H y M252Y y S254T y T256E, o

- Q311H y M252Y y S254T y T256E, o

65

- E430 H y M252Y y S254T y T256E, o

## ES 2 749 383 T3

- N434H y M252Y y S254T y T256E.

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el primer polipéptido de la región Fc comprende

5 una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- ninguna, o

10 - M252Y y S254T y T256E, o

- I253A y H310A y H435A, o

15 - H310A y H433A e Y436A,

y

una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

20 - T307H y N434H, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H,

y el segundo polipéptido de la región Fc comprende

25 una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones:

- ninguna, si el primer polipéptido de la región Fc comprende al menos una mutación, o

30 - T307H, o

- T307Q, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la mutación T307Q, o

- Q311H, o

35 - E430 H, o

- N434H, o

40 - T307H y Q311H, o

- T307H y E430H, o

- T307H y N434A, o

45 - T307H y N434H, o

- T307Q y Q311H, o

50 - T307Q y E430H, o

- T307Q y N434H, o

- T307Q y N434A, o

55 - M252Y y S254T y T256E, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación M252Y y S254T y T256E de mutaciones, o

60 - I253A y H310A y H435A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación I253A y H310A y H435A de mutaciones, o

- H310A y H433A e Y436A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación H310A y H433A e Y436A de mutaciones, o

65 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434Y, o
- 5 - T307Q y Q311H y E430H y N434A, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o
- 10 - T307Q y V308P y N434Y e Y436H.

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el primer polipéptido de la región Fc comprende

- 15 una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- ninguna, o
- 20 - M252Y y S254T y T256E, o
- I253A y H310A y H435A, o
- H310A y H433A e Y436A,

25 y

una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- 30 - T307H y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434H,

y el segundo polipéptido de la región Fc comprende

- 35 una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones:

- ninguna, si el primer polipéptido de la región Fc comprende al menos una mutación, o
- 40 - T307H, o
- T307Q, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la mutación T307Q, o
- E430 H, o
- 45 - T307H y Q311H, o
- T307H y E430H, o
- 50 - T307H y N434A, o
- T307H y N434H, o
- T307Q y Q311H, o
- 55 - T307Q y E430H, o
- T307Q y N434H, o
- 60 - T307Q y N434A, o

- M252Y y S254T y T256E, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación M252Y y S254T y T256E de mutaciones, o

- 65 - I253A y H310A y H435A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación I253A y H310A y H435A de mutaciones, o



- H310A y H433A e Y436A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación H310A y H433A e Y436A de mutaciones, o

5 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H, o

- T307H y Q311H y E430H y N434Y, o

10 - T307Q y Q311H y E430H y N434A, o

- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o

15 - T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o

- T307Q y V308P y N434Y e Y436H.

20 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones I253A y H310A y H435A y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.

En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.

25 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.

En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H.

30 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.

35 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.

40 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.

En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.

45 En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc comprende además las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V ("polipéptido de la región Fc de ojal") y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además las mutaciones S354C y T366W ("polipéptido de la región Fc de botón").

50 En un modo de realización de todos los aspectos, la región Fc de la clase IgG (humana) variante comprende un primer y un segundo polipéptido de la región Fc de la subclase IgG1 humana en la que

a) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

55 b) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además la mutación P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

c) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones L234A y L235A y P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

60 d) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat) y el primer polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y la mutación T366W y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

65 e) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones L234A y L235A y P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat) y el primer polipéptido de la

## ES 2 749 383 T3

región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y la mutación T366W y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y las mutaciones T366S, L368A e Y407V.

5 En un modo de realización, la región Fc de la clase IgG (humana) variante comprende un primer y un segundo polipéptido de la región Fc de la subclase IgG4 humana en la que

a) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

10 b) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además la mutación P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

15 c) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones S228P y L235E y P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat), o

20 d) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat) y el primer polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y la mutación T366W y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y las mutaciones T366S, F368A e Y407V,

25 e) el primer y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden ambos además las mutaciones S228P y L235E y P329G (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat) y el primer polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y la mutación T366W y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además la mutación Y349C o S354C y las mutaciones T366S, L368A e Y407V.

30 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo o polipéptido de fusión de la región Fc que comprende la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento.

35 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

40 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

45 En el presente documento se informa de un ácido nucleico que codifica la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento.

50 En el presente documento se informa de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo como se informa en el presente documento.

55 En el presente documento se informa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento.

60 En el presente documento se informa de una célula huésped que comprende el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

65 En el presente documento se informa de un procedimiento de producción de la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento que comprende cultivar la célula huésped como se informa en el presente documento de modo que se produzca la región Fc de la clase IgG (humana) variante.

70 En el presente documento se informa de un procedimiento de producción del anticuerpo como se informa en el presente documento que comprende cultivar la célula huésped como se informa en el presente documento, de modo que se produzca el anticuerpo.

75 En el presente documento se informa de un procedimiento de producción del polipéptido de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento que comprende cultivar la célula huésped como se informa en el presente documento de modo que se produzca el polipéptido de fusión de la región Fc.

80 Un aspecto como se informa en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento o el anticuerpo como se informa en el presente documento o el polipéptido de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento.

85 Un aspecto como se informa en el presente documento es la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento o el anticuerpo como se informa en el presente documento o el polipéptido de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

90 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de la región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento o el anticuerpo como se informa en el presente documento o el polipéptido

de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

Los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar como, por ejemplo, reclutadores de linfocitos T, como aglutinante del receptor Fc gamma con alta actividad biológica (potencia) y rápida depuración de la circulación sanguínea (suero sanguíneo), como conjugados anticuerpo-fármaco con rápida depuración para reducir los efectos secundarios sistémicos, o como anticuerpos predirigidos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1** Diagrama esquemático ilustrativo de elución por cromatografía de afinidad de FcRn de un anticuerpo que comprende diferentes regiones Fc (variantes): 1: mutación I253A/H310A/H435A; 2: región Fc natural; 3: M252Y/S254T/T256E en un polipéptido de la región Fc, la otra región Fc natural; 4: M252Y/S254T/T256E en ambos polipéptidos de la región Fc; 5: cadena de botón: M252Y/S254T/T256E, cadena de ojal: T307Q/N434A.

**Figura 2** Diagrama de elución por cromatografía de afinidad de FcRn de un anticuerpo que comprende diferentes regiones Fc (variantes): 1: región Fc natural; 2: región Fc glucomanipulada; 3: T307Q/N434A; 4: T307H/N434H; 5: T307H/N434H/ M252Y/S254T/T256E; 6: N434H; 7: M252Y/S254T/T256E.

**Figura 3** Diagrama de elución por cromatografía de afinidad de FcRn de un anticuerpo que comprende diferentes regiones Fc (variantes): 1: región Fc cadena de ojal-cadena de botón 2: cadena de ojal: T307Q/N434A, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E; 3: cadena de ojal: T307H/N434H, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E; 4: cadena de ojal: T250Q/M428L, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E; 5: cadena de ojal: T307Q, N434H, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E/T307Q/N434H; 6: cadena de ojal: T307H/Q311H/E430H/N434H, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E; 7: cadena de ojal: T307H/Q311H/E430H/N434H, cadena de botón: M252Y/S254T/T256E/T307H/Q311H/E430H/N434H; 8: cadena de ojal/botón: M252Y/S254T/T256E.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

### I. DEFINICIONES

El término "aproximadamente" indica un intervalo de un +/- 20 % del siguiente valor numérico posterior. En un modo de realización, el término aproximadamente indica un intervalo de un +/- 10 % del siguiente valor numérico posterior. En un modo de realización, el término aproximadamente indica un intervalo de un +/- 5 % del siguiente valor numérico posterior.

Una "región marco humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región marco que comprende la secuencia de aminoácidos de una región marco del dominio variable de cadena ligera (VL) o una región marco del dominio variable de cadena pesada (VH) derivada de una región marco de inmunoglobulina humana o una región marco consenso humana, como se define a continuación. Una región marco humana aceptora "derivada de" una región marco de inmunoglobulina humana o una región marco consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener alteraciones en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de alteraciones de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región marco humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región marco de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región marco consenso humana.

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

El término "alteración" indica la mutación (sustitución), inserción (adición) o delección de uno o más residuos de aminoácidos en un anticuerpo o polipéptido de fusión original, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende al menos una parte de unión al FcRn de una región Fc, para obtener un anticuerpo o polipéptido de fusión modificado. El término "mutación" indica que el residuo de aminoácido especificado se sustituye por un residuo de aminoácido diferente. Por ejemplo, la mutación L234A indica que el residuo de aminoácido lisina en la posición 234 en una región Fc (polipéptido) de anticuerpo está sustituido por el residuo de aminoácido alanina (sustitución de lisina con alanina) (numeración de acuerdo con el índice EU).

El término "mutación aminoacídica" indica la sustitución de al menos un residuo de aminoácido existente con otro residuo de aminoácido diferente (= residuo de aminoácido de reemplazo). El residuo de aminoácido de reemplazo puede ser un "residuo de aminoácido natural" y seleccionarse del grupo que consiste en alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina

(tyr, Y) y valina (val, V). El residuo de aminoácido de reemplazo puede ser un "residuo de aminoácido no natural". Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.586.207, WO 98/48032, WO 03/073238, US 2004/0214988, WO 2005/35727, WO 2005/74524, Chin, J.W., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W. y Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W., *et al.*, PICAS United States of America 99 (2002) 11020-11024; Wang, L. y Schultz, P.G., Chem. (2002) 1-10.

El término "inserción aminoacídica" indica la incorporación (adicional) de al menos un residuo de aminoácido en una posición predeterminada en una secuencia de aminoácidos. En un modo de realización, la inserción será la inserción de uno o dos residuos de aminoácidos. El/los residuo(s) de aminoácido(s) insertado(s) puede(n) ser cualquier residuo de aminoácido natural o no natural.

El término "deleción aminoacídica" indica la eliminación de al menos un residuo de aminoácido en una posición predeterminada en una secuencia de aminoácidos.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno y/o proteína A y/o FcRn deseada.

El término "región Fc asimétrica" indica un par de polipéptidos de la región Fc que tienen diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat.

El término "región Fc asimétrica con respecto a la unión a FcRn" indica una región Fc que consiste en dos cadenas polipeptídicas que tienen diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes, con lo que las posiciones se determinan de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat, con lo que las diferentes posiciones afectan a la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal humano (FcRn). Para el propósito en el presente documento, las diferencias entre las dos cadenas polipeptídicas de la región Fc en una "región Fc asimétrica con respecto a la unión a FcRn" no incluyen las diferencias que se han introducido para facilitar la formación de regiones Fc heterodiméricas, por ejemplo, para la producción de anticuerpos biespecíficos. Estas diferencias también pueden ser asimétricas, es decir, las dos cadenas tienen diferencias en residuos de aminoácidos no correspondientes de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat. Estas diferencias facilitan la heterodimerización y reducen la homodimerización. Los ejemplos de dichas diferencias son las sustituciones denominadas "botón en ojal" (véanse, por ejemplo, los documentos US 7.695.936 y US 2003/0078385). Se ha descubierto que las siguientes sustituciones de botón en ojal en las cadenas polipeptídicas individuales de una región Fc de un anticuerpo IgG de la subclase IgG1 incrementan la formación de heterodímeros: 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra cadena; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra cadena; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra cadena; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra cadena; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra cadena; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra cadena; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra cadena; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra cadena; y 9) T366W en una cadena y T366S, L368A e Y407V en la otra cadena, con lo que la última enumerada es especialmente adecuada. Además, los cambios que crean nuevos puentes disulfuro entre las dos cadenas polipeptídicas de la región Fc facilitan la formación de heterodímeros (véase, por ejemplo, el documento US 2003/0078385). Se ha descubierto que las siguientes sustituciones que dan como resultado residuos de cisteína separados de manera apropiada para la formación de nuevos enlaces disulfuro intracatenarios en las cadenas polipeptídicas individuales de una región Fc de un anticuerpo IgG de la subclase IgG1 incrementan la formación de heterodímeros: Y349C en una cadena y S354C en la otra; Y349C en una cadena y E356C en la otra; Y349C en una cadena y E357C en la otra; L351C en una cadena y S354C en la otra; T394C en una cadena y E397C en la otra; o D399C en una cadena y K392C en la otra. Otros ejemplos de heterodimerización que facilita los cambios de aminoácidos son las denominadas "sustituciones de pares de carga" (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/089004). Se ha descubierto que las siguientes sustituciones de pares de carga en las cadenas polipeptídicas individuales de una región Fc de un anticuerpo IgG de la subclase IgG1 incrementan la formación de heterodímeros: 1) K409D o K409E en una cadena y D399K o D399R en la otra cadena; 2) K392D o K392E en una cadena y D399K o D399R en la otra cadena; 3) K439D o K439E en una cadena y E356K o E356R en la otra cadena; 4) K370D o K370E en una cadena y E357K o E357R en la otra cadena; 5) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra cadena; 6) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra cadena; 7) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra cadena; 8) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra cadena; 9) K409D y K392D en una cadena y D399K y E356K en la otra cadena; 10) K409D y K392D en una cadena y D399K y D357K en la otra cadena; 11) K409D y K370D en una cadena y D399K y D357K en la otra cadena; 12) D399K en una cadena y K409D y K360D en la otra cadena; y 13) K409D y K439D en una cadena y D399K y E356K en la otra.

El término "unión (a un antígeno)" indica la unión de un anticuerpo a su antígeno en un ensayo *in vitro*, en un modo de realización en un ensayo de unión en el que el anticuerpo se une a una superficie y la unión del antígeno al anticuerpo se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Unión significa una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  M o menos, en algunos modos de realización de  $10^{-13}$  a  $10^{-8}$  M, en algunos modos de realización de  $10^{-13}$  a  $10^{-9}$  M.

La unión se puede investigar mediante un ensayo BIAcore (GE Healthcare Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos  $k_a$  (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del

complejo anticuerpo/antígeno),  $k_d$  (constante de disociación) y  $K_D$  ( $k_d/k_a$ ).

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "dominio CH2" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 231 a la posición EU 340 (sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, un dominio CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01:

```
APELLGG PSVFLFPPKP   KDTLMISRTP EVTCVWDVS   HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA   KTKPREEQ
E STYRWSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAK.
```

El término "dominio CH3" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 341 a la posición EU 446. En un modo de realización, el dominio CH3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2:

```
GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP LDSDGSFFLY ENNYKTPPV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG.
```

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

El término "longitud similar" indica que dos polipéptidos comprenden el número idéntico de residuos de aminoácidos o pueden tener una longitud diferente en uno o más y hasta 10 residuos de aminoácidos como máximo. En un modo de realización, los polipéptidos de la región Fc comprenden el número idéntico de residuos de aminoácidos o difieren en un número de desde 1 a 10 residuos de aminoácidos. En un modo de realización, los polipéptidos de la región Fc comprenden el número idéntico de residuos de aminoácidos o difieren en un número de desde 1 a 5 residuos de aminoácidos. En un modo de realización, los polipéptidos de la región Fc comprenden el número idéntico de residuos de aminoácidos o difieren en un número de desde 1 a 3 residuos de aminoácidos.

El término "derivado de" indica que una secuencia de aminoácidos se deriva de una secuencia de aminoácidos original mediante la introducción de alteraciones en al menos una posición. Por tanto, una secuencia de aminoácidos derivada difiere de la secuencia de aminoácidos original correspondiente en al menos una posición correspondiente (numeración de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat para las regiones Fc del anticuerpo). En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original difiere en uno a quince residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes. En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original difiere en uno a diez residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes. En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original difiere en uno a seis residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes. Del mismo modo, una secuencia de aminoácidos derivada tiene una alta identidad de secuencia de aminoácidos con su secuencia de aminoácidos original. En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original tiene un 80 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos. En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original tiene un 90 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos. En un modo de realización, una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos original tiene un 95 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos.

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "polipéptido de fusión de Fc" indica una fusión de un dominio de unión (por ejemplo, un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo monocatenario, o un polipéptido tal como un ligando de un receptor) con una región Fc de anticuerpo que presenta la actividad de unión deseada a la diana y/o a la proteína A y/o al FcRn.

El término "región Fc de origen humano" indica la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina de origen humano que contiene al menos una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. En un modo de realización, la región Fc tiene la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 60. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91 3242. La región Fc está compuesta por dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada, que se pueden enlazar covalentemente entre sí por medio de residuos de cisteína de la región bisagra que forman enlaces disulfuro interpolipeptídicos.

El término "FcRn" indica el receptor Fc neonatal humano. El FcRn funciona rescatando a la IgG de la vía de degradación lisosómica, dando como resultado una depuración reducida y una semivida incrementada. El FcRn es una proteína heterodimérica que consiste en dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I de 50 kDa ( $\alpha$ -FcRn) y una microglobulina  $\beta 2$  ( $\beta 2m$ ) de 15 kDa. El FcRn se une con afinidad alta a la parte CH2-CH3 de la región Fc de la IgG. La interacción entre IgG y FcRn depende estrictamente del pH y se produce en una estequiometría 1:2, uniéndose una IgG a dos moléculas de FcRn por medio de sus dos cadenas pesadas (Huber, A.H., *et al.*, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083). La unión al FcRn se produce en el endosoma a pH ácido (pH < 6,5) y se libera IgG en la superficie celular neutra (pH de aproximadamente 7,4). La naturaleza sensible al pH de la interacción facilita la protección mediada por FcRn de las IgG pinocitadas en las células a partir de la degradación intracelular mediante la unión al receptor en el entorno ácido de los endosomas. A continuación, el FcRn facilita el reciclado de la IgG a la superficie celular y su posterior liberación en la circulación sanguínea tras la exposición del complejo FcRn-IgG al entorno de pH neutro fuera de la célula.

El término "parte de unión a FcRn de una región Fc" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 243 a la posición EU 261 y aproximadamente desde la posición EU 275 a la posición EU 293 y aproximadamente desde la posición EU 302 a la posición EU 319 y aproximadamente desde la posición EU 336 a la posición EU 348 y aproximadamente desde la posición EU 367 a la posición EU 393 y la posición EU 408 y aproximadamente desde la posición EU 424 a la posición EU 440. En un modo de realización, se alteran uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos de acuerdo con la numeración EU de Kabat F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 y S440 (numeración EU).

"Región marco" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento. Un anticuerpo de longitud completa puede comprender otros dominios, tales como, por ejemplo, un scFv o un scFab conjugado con una o más de las cadenas del anticuerpo de longitud completa. Estos conjugados también están englobados por el término anticuerpo de longitud completa.

Los términos "heterodímero" o "heterodimérico" indican una molécula que comprende dos cadenas polipeptídicas (por ejemplo, de longitud similar), en las que las dos cadenas polipeptídicas tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un residuo de aminoácido diferente en una posición correspondiente, con lo que la posición correspondiente se determina de acuerdo con el índice EU de Kabat.

Los términos "homodímero" y "homodimérico" indican una molécula que comprende dos cadenas polipeptídicas de longitud similar, en las que las dos cadenas polipeptídicas tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en las posiciones correspondientes, con lo que las posiciones correspondientes se determinan de acuerdo con el índice EU de Kabat.

Un anticuerpo o polipéptido de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento puede ser homodimérico o heterodimérico con respecto a su región Fc que se determina con respecto a las mutaciones o propiedades que son el centro de atención. Por ejemplo, con respecto a la unión a FcRn y/o proteína A (es decir, la centrada en las propiedades) una región Fc (anticuerpo) es homodimérica (es decir, ambos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada comprenden estas mutaciones) con respecto a las mutaciones H310A, H433A e Y436A (estas mutaciones están en el centro de atención con respecto a la propiedad de unión a FcRn y/o proteína A del anticuerpo o polipéptido de fusión de la región Fc) pero al mismo tiempo es heterodimérica con respecto a las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V (estas mutaciones no son el centro de atención ya que estas mutaciones se dirigen a la heterodimerización de las cadenas pesadas y no a las propiedades de unión a FcRn/proteína A), así como a las mutaciones S354C y T366W, respectivamente (el primer conjunto está comprendido solo en el primer polipéptido de la

región Fc mientras que el segundo conjunto está comprendido solo en el segundo polipéptido de la región Fc). Además, por ejemplo, un polipéptido de fusión de la región Fc o un anticuerpo como se informa en el presente documento puede ser heterodimérico con respecto a las mutaciones I253A, H310A, H433A, H435A e Y436A (es decir, estas mutaciones se dirigen todas a las propiedades de unión a FcRn y/o proteína A del polipéptido dimérico), es decir, un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones I253A, H310A y H435A, mientras que el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones H310A, H433A e Y436A.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Una "región marco consenso humana" es una región marco que representa los residuos de aminoácidos que se producen lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

El término "polipéptido de la región Fc humana" indica una secuencia de aminoácidos que es idéntica a un polipéptido de la región Fc humana "natural". El término "polipéptido de la región Fc (humana) variante" indica una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de la región Fc humana "natural" en virtud de al menos una "alteración de aminoácidos". Una "región Fc humana" consiste en dos polipéptidos de la región Fc humana. Una "región Fc (humana) variante" consiste en dos polipéptidos de la región Fc, con lo que ambos pueden ser polipéptidos de la región Fc (humana) variante o uno es un polipéptido de la región Fc humana y el otro es un polipéptido de la región Fc (humana) variante.

En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc humana tiene la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana de SEQ ID NO: 03, o de un polipéptido de la región Fc de la IgG2 humana de SEQ ID NO: 04, o de un polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana de SEQ ID NO: 05, o de un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana de SEQ ID NO: 06. En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc (humana) variante se deriva de un polipéptido de la región Fc de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06 y tiene al menos una mutación aminoacídica en comparación con el polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06. En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc (humana) variante comprende/tiene de aproximadamente una a aproximadamente doce mutaciones aminoacídicas, y en un modo de realización de aproximadamente una a aproximadamente ocho mutaciones aminoacídicas. En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc (humana) variante tiene al menos aproximadamente un 80 % de homología con un polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06. En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc (humana) variante tiene menos de aproximadamente un 90 % de homología con un polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06. En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc (humana) variante tiene al menos aproximadamente un 95 % de homología con un polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06.

El polipéptido de la región Fc (humana) variante derivado de un polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06 se define por las alteraciones de aminoácidos que están contenidas. Por tanto, por ejemplo, el término P329G indica un polipéptido de la región Fc (humana) variante derivado del polipéptido de la región Fc humana con la mutación de prolina a glicina en la posición aminoacídica 329 con respecto al polipéptido de la región Fc humana de SEQ ID NO: 03, o 04, o 05, o 06.

Como se usa en el presente documento, las posiciones aminoacídicas de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" en el presente documento. Específicamente el sistema de numeración de Kabat (véanse las páginas 647-660) de Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD (1991) se usa para el dominio constante de cadena ligera CL del isotipo kappa y lambda y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (véanse las páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y

CH3).

Un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 03).

10 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 07).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

20 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 08).

25 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 09).

35 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones L234A, L235A y mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

40 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 10).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una L234A, L235A y mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

45 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 11).

50 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

55 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 12).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones L234A, L235A y mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

60 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG



## ES 2 749 383 T3

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 13).

5 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una mutación P239G y mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
10 (SEQ ID NO: 14).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones P329G y mutación S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 15).

20 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones L234A, L235A, P329G e Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
25 (SEQ ID NO: 16).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con mutaciones L234A, L235A, P329G y mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 17).

35 Un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK  
40 (SEQ ID NO: 06).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con mutaciones S228P y L235E tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

45 ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK  
(SEQ ID NO: 18).

50 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con mutaciones S228P, L235E y mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

55 ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK  
(SEQ ID NO: 19).

60 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVK

## ES 2 749 383 T3

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 20).

5 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

10 ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 21).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con mutaciones S228P, L235E y S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 22).

20 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E y mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

25 ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 23).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 24).

35 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una P239G y mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

40 ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 25).

45 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una P239G y mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

50 ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 26).

Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E, P329G y mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

55 ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLK  
(SEQ ID NO: 27).

60 Un polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E, P329G y mutaciones S354C, T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLGSSIEKTKAKGQPREPQVYVTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK  
(SEQ ID NO: 28).

5 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

15 El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR como se indican en el presente documento incluyen

20 (a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

25 (b) las CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);

(c) los contactos con antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y

30 (d) las combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen residuos de aminoácidos de las HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

35 A menos que se indique de otro modo, los residuos de las HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat (Kabat *et al.*, *supra*).

40 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

45 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, J. Chrom. B 848 (2007) 79-87.

50 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

55 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en

fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

5 Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

15 El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ por la fracción } X/Y$$

45 donde X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

55 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

60 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

65 El término "conector peptídico" como se usa en el presente documento indica un péptido con secuencias de aminoácidos, que está en un modo de realización de origen sintético. En un modo de realización, el conector peptídico es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 30 aminoácidos, en un modo de realización con una longitud de 32 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, el conector peptídico es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 a 40 aminoácidos. En un modo de realización, el conector

peptídico es (GxS)<sub>n</sub> con G = glicina, S = serina, (x = 3, n = 8, 9 o 10) o (x = 4 y n = 6, 7 u 8), en un modo de realización con x = 4, n = 6 o 7, en un modo de realización con x = 4, n = 7. En un modo de realización, el conector peptídico es (G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub>G<sub>2</sub>.

5 El término "anticuerpo recombinante" indica todos los anticuerpos (quiméricos, humanizados y humanos) que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes. Esto incluye anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes tienen regiones variables y constantes en forma reordenada. Los anticuerpos recombinantes como se informa en el presente documento se pueden someter a hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de secuencias de VH y VL de la estirpe germinal humana y están relacionadas con ellas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la estirpe germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

15 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de las metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejoría o atenuación de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan anticuerpos o polipéptidos de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

25 El término "-valente" como se usa en la presente solicitud indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula (anticuerpo). Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula (anticuerpo). Los anticuerpos biespecíficos como se informa en el presente documento son "bivalentes" en un modo de realización preferente.

30 El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, Kuby Immunology, 6.<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

40 El término "enfermedad vascular ocular" incluye, pero no se limita a, síndromes neovasculares intraoculares tales como retinopatía diabética, edema macular diabético, retinopatía del prematuro, glaucoma neovascular, oclusiones de la vena retiniana, oclusiones de la vena retiniana central, degeneración macular, degeneración macular senil, retinitis pigmentaria, proliferación angiomasosa retiniana, telangectasia macular, retinopatía isquémica, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, neovascularización corneal, neovascularización retiniana, neovascularización coroidea y degeneración retiniana (véase, por ejemplo, Gamer, A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Gamer, A., y Klintworth, G.K., (eds.), 2.<sup>a</sup> edición, Marcel Dekker, Nueva York (1994), pp. 1625-1710).

50 El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

55 El término "con (la) mutación IHH-AAA" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de las mutaciones I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) y H435A (His435Ala) y el término "con (la) mutación HHY-AAA" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de las mutaciones H310A (His310Ala), H433A (His433Ala) e Y436A (Tyr436Ala) y el término "con (la) mutación YTE" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de mutaciones M252Y (Met252Tyr) S254T (Ser254Thr) y T256E (Thr256Glu) en la región de cadena pesada constante de las subclases IgG1 o IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat.

65 El término "con (las) mutaciones P329G LALA" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de las mutaciones L234A (Leu234Ala), L235A (Leu235Ala) y P329G (Pro329Gly) en la región de cadena pesada constante de la subclase IgG1, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat. El término "con (la)

mutación SPLE" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de las mutaciones S228P (Ser228Pro) y L235E (Leu235Glu) en la región de cadena pesada constante de la subclase IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat. El término "con (la) mutación SPLE y P239G" como se usa en el presente documento se refiere a la combinación de las mutaciones S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) y P329G (Pro329Gly) en la región de cadena pesada constante de la subclase IgG4, en las que la numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat.

## II. LA INVENCION ACTUAL

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la unión a FcRn de un anticuerpo o polipéptido de fusión de la región Fc se puede modificar alterando residuos de aminoácidos en posiciones no correspondientes en los polipéptidos de la región Fc individuales, ya que estas alteraciones actúan conjuntamente en la modificación de la unión a FcRn. Las regiones Fc, los anticuerpos y los polipéptidos de fusión de la región Fc como se informa en el presente documento son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades en las que se requieren tiempos de retención sistémica adaptados individualmente.

En el presente documento, se informa de regiones Fc variantes que tienen propiedades de unión a FcRn modificadas en comparación con una región Fc natural correspondiente. Estas regiones Fc variantes contienen mutaciones aminoacídicas específicas en el dominio CH2 y/o CH3. Se ha descubierto que estas mutaciones, cuando se usan solas o bien en combinación en la misma cadena pesada o en ambas cadenas pesadas de una región Fc, permiten diseñar a medida la semivida *in vivo* de la región Fc variante.

### A. El receptor Fc neonatal (FcRn)

El receptor Fc neonatal (FcRn) es importante para el destino metabólico de los anticuerpos de la clase IgG *in vivo*. El FcRn funciona rescatando a la IgG natural de la vía de degradación lisosómica, dando como resultado una depuración reducida y una semivida incrementada. Es una proteína heterodimérica que consiste en dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I de 50 kDa ( $\alpha$ -FcRn) y una microglobulina  $\beta$ 2 ( $\beta$ 2m) de 15 kDa. El FcRn se une con afinidad alta a la parte CH2-CH3 de la región Fc de un anticuerpo de la clase IgG. La interacción entre un anticuerpo de la clase IgG y el FcRn depende del pH y se produce en una estequiometría 1:2, es decir, una molécula de anticuerpo IgG puede interactuar con dos moléculas de FcRn por medio de sus dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada (véase, por ejemplo, Huber, A.H., *et al.*, J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083).

Por tanto, las propiedades/características de la unión al FcRn *in vitro* de las IgG son indicativas de sus propiedades farmacocinéticas *in vivo* en la circulación sanguínea.

En la interacción entre el FcRn y la región Fc de un anticuerpo de la clase IgG participan diferentes residuos de aminoácidos del dominio CH2 y CH3 de cadena pesada. Los residuos de aminoácidos que interactúan con el FcRn se localizan aproximadamente entre la posición EU 243 y la posición EU 261, aproximadamente entre la posición EU 275 y la posición EU 293, aproximadamente entre la posición EU 302 y la posición EU 319, aproximadamente entre la posición EU 336 y la posición EU 348, aproximadamente entre la posición EU 367 y la posición EU 393, en la posición EU 408, y aproximadamente entre la posición EU 424 y la posición EU 440. Más específicamente, los siguientes residuos de aminoácidos de acuerdo con la numeración EU de Kabat están implicados en la interacción entre la región Fc y el FcRn: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 y S440.

Los estudios de mutagénesis dirigida por sitio han demostrado que los sitios de unión críticos en la región Fc de las IgG para FcRn son histidina 310, histidina 435 e isoleucina 253 y, en menor medida, histidina 433 y tirosina 436 (véase, por ejemplo, Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825; Raghavan, M., *et al.*, Biochem. 34 (1995) 14649-14657; Medesan, C., *et al.*, J. Immunol. 158 (1997) 2211-2217).

Los procedimientos para incrementar la unión de IgG al FcRn se han realizado mediante la mutación de IgG en diversos residuos de aminoácidos: treonina 250, metionina 252, serina 254, treonina 256, treonina 307, ácido glutámico 380, metionina 428, histidina 433 y asparagina 434 (véase Kuo, T.T., *et al.*, J. Clin. Immunol. 30 (2010) 777-789).

En algunos casos, se desean anticuerpos con una semivida reducida en la circulación sanguínea. Por ejemplo, los fármacos para aplicación intravítrea deben tener una semivida prolongada en el ojo y una semivida corta en la circulación del paciente. Dichos anticuerpos también tienen la ventaja de una exposición incrementada a un sitio de enfermedad, por ejemplo, en el ojo.

Se conocen diferentes mutaciones que influyen en la unión al FcRn y, con ello, en la semivida en la circulación sanguínea. Se han identificado residuos de la región Fc críticos para la interacción Fc de ratón-FcRn de ratón mediante mutagénesis dirigida por sitio (véase, por ejemplo, Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Immunol 169 (2002) 5171-5180). Los residuos I253, H310, H433, N434 y H435 (numeración EU de acuerdo con Kabat) están implicados en la interacción (Medesan, C., *et al.*, Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533-2536; Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542-548). Se descubrió que los residuos I253, H310 y H435 eran críticos para la interacción de Fc humana con FcRn murino (Kim, J.K., *et al.*, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825). Los residuos M252Y, S254T, T256E se han descrito por Dall'Acqua *et al.* para mejorar la unión al FcRn mediante estudios de interacción proteína-proteína (Dall'Acqua, W.F., *et al.* J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524). Los estudios del complejo Fc humana-FcRn humano han demostrado que los residuos I253, S254, H435 e Y436 son cruciales para la interacción (Firan, M., *et al.*, Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). En Yeung, Y.A., *et al.* (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) se ha informado de y examinado diversos mutantes de los residuos 248 a 259 y 301 a 317 y 376 a 382 y 424 a 437. Las mutaciones ejemplares y su efecto sobre la unión al FcRn se enumeran en la siguiente tabla.

**Tabla.**

mutación	efecto sobre la unión al FcRn	semivida en la circulación	referencia
H285 H310Q/H433N (IgG1 murina)	reducido (murino)	reducida (en ratón)	Kim, J.K., Scand. J. Immunol. 40 (1994) 457-465
I253A H310A H435A H436A (IgG1 murina)	reducido (murino)	reducida (en ratón)	Ghetie, V. y Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592-598
T252L/T254S/T256F T252A/T254S/T256A (IgG1 murina)	incrementado (murino)	incrementada (en ratón)	Ghetie, V. y Ward, E.S., Immunol. Today 18 (1997) 592-598
I253A H310A H435A H436A H433A/N434Q (IgG1 murina)	reducido (murino)	reducida (en ratón)	Medesan, C., <i>et al.</i> , J. Immunol. 158 (1997) 2211-2217
I253A H310A H435A H435R (IgG1 humana)	reducido H310A: <0,1 unión rel. a muFcRn (murino)	reducida (en ratón)	Kim, J.K., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825
H433A (IgG1 humana)	1,1 unión rel. a muFcRn, 0,4 unión rel. a hu FcRn (murino)		Kim, J.K., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2825
I253A S254A H435A Y436A (IgG1 humana)	reducido <0,1 unión relativa a huFcRn	reducida	Shields, R.L., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
R255A K288A L309A S415A H433A (IgG1 humana)	reducido (humano)	reducida	Shields, R.L., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
P238A T256A E272A V305A T307A Q311A D312A K317A	incrementado (humano)	incrementada	Shields, R.L., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604

mutación	efecto sobre la unión al FcRn	semivida en la circulación	referencia
D376A A378Q E380A E382A S424A N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (IgG1 humana)			
H435A (IgG1 humanizada)	reducido <0,1 unión rel. a huFcRn	reducida	Firan, M., <i>et al.</i> , Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002
I253A (sin unión) M252W M252Y M252Y/T256Q M252F/T256D N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E G385A/Q386P/N389S H433K/N434F/Y436H H433R/N434Y/Y436H G385R/Q386T/P387R/N389P M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H M252Y/S254T/T256E/G385R/Q386T/P387R/N389P (IgG1 humana)	incrementado (murino y humano)	reducida (en ratón)	Dall'Acqua, J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180
M428L T250Q/M428L (IgG2 humana)	incrementado (humano)	incrementada (en mono)	Hinton, P.R., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 279 (2004) 6213-6216
M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (IgG humana)	incrementado (humano)	incrementada (en ratón)	Vaccaro, C., <i>et al.</i> , Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1283-1288
T307A/E380A/N434A (IgG1 quimérica)	incrementado	incrementada en ratón transgénico	Pop, L.M., <i>et al.</i> , Int. Immunopharmacol. 5 (2005) 1279-1290
T250Q E380A M428L N434A K288A/N434A E380A/N434A T307A/E380A/N434A (IgG1 humana)	incrementado (humano)	incrementada en ratón transgénico	Petkova, S.B., <i>et al.</i> , Int. Immunol 18 (2006) 1759-1769
I253A (IgG1 humana)	reducido (humano)	reducida en ratón transgénico	Petkova, S.B., <i>et al.</i> , Int. Immunol 18 (2006) 1759-1769
S239D/A330L/I332E M252Y/S254T/T256E (humanizada)	incrementado (humano y macaco de Java)	incrementada en macaco de Java	Dall'Acqua, W.F., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 281 (2006) 23514-23524
T250Q M428L T250Q/M428L (IgG1 humana)	incrementado (humano)	incrementada en macacos de la India	Hinton, P.R., <i>et al.</i> , J. Immunol. 176 (2006) 346-356
T250Q/M428L P257I/Q311I (IgG1 humanizada)	incrementado (ratón y macaco de Java)	sin cambio en macaco de Java incrementada en ratón	Datta-Mannan, A., <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 282 (2007) 1709-1717
P257I/Q311I	incrementado a pH 6	reducida en ratones	Datta-Mannan, A., <i>et al.</i> ,



mutación	efecto sobre la unión al FcRn	semivida en la circulación	referencia
P257I/N434H D376V/N434H (IgG1 humanizada)	(humano, macaco de Java, ratón)	P257I/N434H reducida en macaco de Java	Drug Metab. Dispos. 35 (2007) 86-94
anular la unión a FcRn: I253 H310 H433 H435 reducir la unión a FcRn: Y436 unión incrementada a FcRn: T250 N252 S254 T256 T307 M428 N434	incrementado y reducido	la reducción de la capacidad de unión de IgG para FcRn reduce su persistencia sérica; una interacción FcRn-IgG de mayor afinidad prolonga las semividas de los fármacos acoplados con IgG y Fc en el suero	Ropeenian, D.C. y Akilesh, S., Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 715-725
N434A T307Q/N434A T307Q/N434S V308P/N434A T307Q/E380A/N434A (IgG1 humana)	incrementado (macaco de Java)	incrementada en macaco de Java	Yeung, Y.A., <i>et al.</i> , Cancer Res. 70 (2010) 3269-3277
256P 280K 339T 385H 428L 434W/Y/F/A/H (IgG humana)	incrementado a pH neutro		Documento WO 2011/122011

5 Se ha descubierto que una mutación unilateral en un polipéptido de la región Fc es suficiente para debilitar significativamente la unión a un receptor Fc. Cuantas más mutaciones se introducen en la región Fc, más débil se vuelve la unión al FcRn. Pero las mutaciones asimétricas unilaterales no son suficientes para inhibir completamente la unión al FcRn. Son necesarias mutaciones en ambos lados para inhibir completamente la unión al FcRn.

10 Por tanto, la región Fc de la clase IgG (humana) variante es un heterodímero y el emparejamiento del primer polipéptido de la región Fc (de cadena pesada) y el segundo polipéptido de la región Fc (de cadena pesada) para formar una región Fc funcional da como resultado la formación de un heterodímero.

15 Los resultados de una genomanipulación simétrica de una región Fc de la IgG1 para influir en la unión al FcRn se muestran en la tabla siguiente (alineación de mutaciones y tiempo de retención en una columna de cromatografía de afinidad del FcRn).

**Tabla.**

mutaciones que influyen en la función efectora	mutación 1 que influye en la unión al FcRn	mutación 2 que influye en la unión al FcRn	mutación 3 que influye en la unión al FcRn	tiempo de retención de la columna de afinidad del FcRn [min]
L234A/L235A/P329G	---	---	---	45,3
L234A/L235A/P329G	I253A	H310A	H435A	2,3
L234A/L235A/P329G	I253A	---	---	2,7
L234A/L235A/P329G	---	H310A	---	2,4
L234A/L235A/P329G	---	---	H435A	2,7
L234A/L235A/P329G	I253A	H310A	---	2,3
L234A/L235A/P329G	I253A	---	H435A	2,3
L234A/L235A/P329G	---	H310A	H435A	2,4

mutaciones que influyen en la función efectora	mutación 1 que influye en la unión al FcRn	mutación 2 que influye en la unión al FcRn	mutación 3 que influye en la unión al FcRn	tiempo de retención de la columna de afinidad del FcRn [min]
L234A/L235A/P329G	---	H310A	Y436A	2,3
L234A/L235A/P329G	H310A	H433A	Y436A	2,4
L234A/L235A/P329G	---	---	Y436A	41,3

Los tiempos de retención inferiores a 3 minutos corresponden a la ausencia de unión, ya que la sustancia se encuentra en el flujo continuo (pico de vacío).

5 La mutación única H310A es la mutación simétrica más silenciosa para eliminar cualquier unión al FcRn.

La mutación única simétrica I253A y H435A da como resultado una variación relativa del tiempo de retención de 0,3-0,4 min. Esto se puede considerar, en general, una unión no detectable.

10 La mutación única Y436A da como resultado una fuerza de interacción detectable en la columna de afinidad del FcRn. Sin estar ligados a esta teoría, esta mutación podría tener una semivida mediada por el FcRn que se puede diferenciar de una interacción cero, tal como la combinación de las mutaciones I253A, H310A y H435A (mutación IHH-AAA).

15 Los resultados obtenidos con un anticuerpo anti-HER2 modificado simétricamente se presentan en la tabla siguiente (véase el documento WO 2006/031370 como referencia).

**Tabla.**

mutación	tiempo de retención [min]
I253H	sin unión
M252D	sin unión
S254D	sin unión
R255D	41,4
M252H	43,6
K288E	45,2
L309H	45,5
E258H	45,6
T256H	46,0
K290H	46,2
D98E	46,2
natural	46,3
K317H	46,3
Q311H	46,3
E430H	46,4
T307H	47,0
N434H	52,0

20 La región Fc en el polipéptido de fusión de la región Fc confiere las características descritas anteriormente a su pareja de fusión. La pareja de fusión puede ser cualquier molécula que tenga una actividad biológica cuya semivida *in vivo* se reduzca o incremente, es decir, cuya semivida *in vivo* se defina claramente y se adapte individualmente para su aplicación prevista.

25 Los polipéptidos de fusión de la región Fc pueden comprender, por ejemplo, una región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento y una proteína receptora que se une a una diana que incluye un ligando, tal como, por ejemplo, el polipéptido de fusión de la región Fc del TNFR (TNFR = receptor del factor de necrosis tumoral humano), o un polipéptido de fusión de la región Fc del IL-1R (IL-1R = receptor de interleucina humana 1), o polipéptidos de fusión de la región Fc del VEGFR (VEGFR = receptor del factor de crecimiento endotelial vascular humano), o polipéptidos de fusión de la región Fc del ANG2R (ANG2R = receptor de angiopoyetina 2 humana).

30 Los polipéptidos de fusión de la región Fc pueden comprender, por ejemplo, una región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento y un fragmento de anticuerpo que se une a una diana, incluyendo,

tal como, por ejemplo, un fragmento Fab de anticuerpo, scFvs (véase, por ejemplo, Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1126-1136), o anticuerpos de dominio (dAbs) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2004/058821, WO 2003/002609).

- 5 Los polipéptidos de fusión de la región Fc pueden comprender, por ejemplo, una región Fc de la clase IgG (humana) variante como se informa en el presente documento y un ligando del receptor (natural o bien artificial).

**B. Regiones Fc ejemplares y anticuerpos que comprenden estas regiones Fc**

- 10 En un aspecto, la invención proporciona regiones Fc que tienen una unión al FcRn modificada, es decir, estas regiones Fc se unen al FcRn humano con una afinidad mayor o menor que una región Fc que no tiene mutaciones que afecten a la unión al FcRn.

- 15 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que tienen una unión al FcRn modificada, es decir, estos anticuerpos se unen al FcRn humano con una afinidad mayor o menor que un anticuerpo que no tiene mutaciones que afecten a la unión al FcRn.

- 20 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo que comprende una región Fc (variante) que comprende un primer polipéptido de la región Fc y un segundo polipéptido de la región Fc,

en el que

- 25 a) el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc se derivan del mismo polipéptido de la región Fc humana, y

- 30 b) el primer polipéptido de la región Fc se ha modificado de forma que su secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de la región Fc al menos en una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat, y el segundo polipéptido de la región Fc se ha modificado de forma que su secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido de la región Fc al menos en una posición correspondiente de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat, con lo que la posición modificada en el primer polipéptido de la región Fc y la posición modificada en el segundo polipéptido de la región Fc son diferentes, y

- 35 c) la región Fc tiene una afinidad diferente por un receptor Fc humano en comparación con una región Fc que comprende como primer y segundo polipéptido de la región Fc el polipéptido de la región Fc humana de a) (es decir, que tiene los mismos residuos de aminoácidos que el polipéptido de la región Fc humana de a) en las posiciones correspondientes de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat).

40 en el que el primer polipéptido de la región Fc o bien el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- T307H y N434H.

45 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento

el primer polipéptido de la región Fc comprende independientemente del segundo polipéptido de la región Fc una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

50 - T307H y N434A, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H, o

- T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E,

55 y

el segundo polipéptido de la región Fc comprende independientemente del primer polipéptido de la región Fc una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones

60 - T307H, o

- T307Q, o

- Q311H, o

65 - E430 H, o

- N434H, o
- 5 - T307H y Q311H, o
- T307H y E430H, o
- T307H y N434A, o
- 10 - T307H y N434H, o
- T307Q y Q311H, o
- T307Q y E430H, o
- 15 - T307Q y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434A, o
- 20 - T307H y Q311H y E430H y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434Y, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434A, o
- 25 - T307Q y Q311H y E430H y N434H, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o
- 30 - T307Q y V308P y N434Y e Y436H, o
- T307H y M252Y y S254T y T256E, o
- Q311H y M252Y y S254T y T256E, o
- 35 - E430 H y M252Y y S254T y T256E, o
- N434H y M252Y y S254T y T256E.
- 40 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el primer polipéptido de la región Fc comprende una de las siguientes combinaciones de mutaciones:
- 45 - ninguna, o
- M252Y y S254T y T256E, o
- I253A y H310A y H435A, o
- 50 - H310A y H433A e Y436A,
- y
- 55 una de las siguientes combinaciones de mutaciones:
- T307H y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434H,
- 60 y el segundo polipéptido de la región Fc comprende una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones:
- 65 - ninguna, si el primer polipéptido de la región Fc comprende al menos una mutación, o

## ES 2 749 383 T3

- T307H, o
- T307Q, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la mutación T307Q, o
- 5 - Q311H, o
- E430 H, o
- N434H, o
- 10 - T307H y Q311H, o
- T307H y E430H, o
- 15 - T307H y N434A, o
- T307H y N434H, o
- T307Q y Q311H, o
- 20 - T307Q y E430H, o
- T307Q y N434H, o
- 25 - T307Q y N434A, o
- M252Y y S254T y T256E, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación M252Y y S254T y T256E de mutaciones, o
- 30 - I253A y H310A y H435A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación I253A y H310A y H435A de mutaciones, o
- H310A y H433A e Y436A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación H310A y H433A e Y436A de mutaciones, o
- 35 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o
- T307H y Q311H y E430H y N434H, o
- 40 - T307H y Q311H y E430H y N434Y, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434A, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o
- 45 - T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o
- T307Q y V308P y N434Y e Y436H.
- 50 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.
- En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.
- 55 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H.
- 60 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.
- En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.
- 65

En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.

5 En un modo de realización preferente, el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.

10 En un modo de realización de todos los aspectos, la región Fc es una región Fc de la clase IgG (humana) variante. En un modo de realización, la región Fc de la clase IgG (humana) variante es una región Fc heterodimérica de la clase IgG.

15 En un modo de realización de todos los aspectos, el emparejamiento del primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc para formar una región Fc (funcional) da como resultado la formación de un heterodímero.

20 En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc humana es un polipéptido de la región Fc humana de la subclase IgG1 o de la subclase IgG4.

25 En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc humana es un polipéptido de la región Fc humana de la subclase IgG1 que comprende además las mutaciones L234A, L235A y P329G.

30 En un modo de realización, el polipéptido de la región Fc humana es un polipéptido de la región Fc humana de la subclase IgG4 que comprende además las mutaciones S228P y L235E.

35 En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc comprende además las mutaciones S354C y T366W y el segundo polipéptido de la región Fc comprende además las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V.

40 En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región Fc de iii) es de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región Fc de la subclase IgG1 humana comprende además las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región Fc de iii) es de la subclase IgG4 humana. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región Fc de la subclase IgG4 humana comprende además las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que la región Fc de la subclase IgG4 humana comprende además las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

50 Todavía otros aspectos como se informa en el presente documento son una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico, la formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares, el uso del anticuerpo biespecífico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares, un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece enfermedades vasculares oculares mediante la administración del anticuerpo biespecífico a un paciente que necesite dicho tratamiento. En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico o la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico se administra por medio de aplicación intravítrea.

55 En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento, caracterizado por expresar un ácido nucleico como se informa en el presente documento en una célula huésped procarionota o eucariota y recuperar el anticuerpo biespecífico de la célula o el sobrenadante de cultivo celular. Un modo de realización es un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento que comprende las etapas de

a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo;

55 b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis del anticuerpo; y

c) recuperar el anticuerpo del cultivo.

60 En el presente documento se informa del anticuerpo obtenido por dicho procedimiento para la producción de un anticuerpo biespecífico.

65 Los anticuerpos como se informa en el presente documento tienen propiedades muy valiosas debido a sus modificaciones específicas en la región Fc que provocan un beneficio para un paciente que padece enfermedades vasculares oculares. Muestran una alta estabilidad en el entorno intravítreo y una lenta difusión desde el ojo (en comparación con los fragmentos de anticuerpos más pequeños sin una región de cadena pesada constante), donde se localiza y trata la enfermedad real (por lo que, potencialmente, la pauta de tratamiento se puede mejorar en comparación con anticuerpos no de tipo IgG como, por ejemplo, fragmentos Fab y (Fab)<sub>2</sub>). Por otra parte, los

anticuerpos como se informa en el presente documento se eliminan bastante rápidamente del suero (lo que es altamente deseable para reducir los posibles efectos secundarios derivados de la exposición sistémica). Sorprendentemente, también muestran una viscosidad más baja (en comparación con las versiones sin la combinación de las mutaciones I253A, H310A y H435A en la región constante) y, por lo tanto, son especialmente útiles para la aplicación intravítrea a través de agujas finas durante el tratamiento de enfermedades oculares (para dicha aplicación se usan típicamente agujas finas y la alta viscosidad hace que una aplicación apropiada sea bastante difícil). La viscosidad más baja también permite formulaciones de concentración más alta.

También sorprendentemente, los anticuerpos como se informa en el presente documento muestran una menor tendencia a la agregación durante el almacenamiento (en comparación con las versiones sin la combinación de las mutaciones I253A, H310A y H435A en la región Fc), lo que es esencial para la aplicación intravítrea en el ojo (ya que una agregación en el ojo puede dar lugar a complicaciones durante dicho tratamiento).

Los anticuerpos biespecíficos como se informa en el presente documento muestran una buena eficacia en la inhibición de enfermedades vasculares.

En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos como se informa en el presente documento debido a sus modificaciones específicas en la región constante (por ejemplo, P329G LALA) muestran propiedades valiosas como la ausencia de unión de/a los receptores Fc gamma, lo que reduce el riesgo de efectos secundarios como la trombosis y/o la muerte celular no deseada (debido a, por ejemplo, ADCC).

En un modo de realización como se informa en el presente documento, el anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento es bivalente.

En un modo de realización, el dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo y el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo de la cadena pesada y ligera del segundo anticuerpo de longitud completa se estabilizan adicionalmente mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las siguientes posiciones: posición 44 del dominio variable de cadena pesada y posición 100 del dominio variable de cadena ligera (numeración de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las técnicas para introducir puentes disulfuro para la estabilización se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/029350, Rajagopal, V., *et al.*, Prot. Eng. 10 (1997) 1453-1459, Kobayashi *et al.*, Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393, y Schmidt, M., *et al.*, Oncogene 18 (1999) 1711-1721.

En un modo de realización, los dominios CH3 del anticuerpo biespecífico bivalente como se informa en el presente documento se alteran por la tecnología "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621, y Merchant, A.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "cadena de botón", mientras que el otro es el "cadena de ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681, Atwell, S., *et al.* J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) e incrementa el rendimiento.

En un modo de realización preferente de todos los aspectos como se informa en el presente documento los anticuerpos biespecíficos se caracterizan por que

el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se encuentran cada uno en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo,

en el que la interfase se altera para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada,

de modo que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico,

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada,

y

b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada,

de modo que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfase original del

primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico,

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro del cual se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Por tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención está en un modo de realización preferente caracterizado por que

el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de a) y el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de b) se encuentran cada uno en una interfase que comprende una alteración en la interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo,

en la que

i) en el dominio CH3 de una cadena pesada

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada,

y en la que

ii) en el dominio CH3 de la otra cadena pesada

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro del cual se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

En un modo de realización preferente, el residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

En un modo de realización preferente, el residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En un modo de realización, ambos dominios CH3 se alteran además mediante la introducción de un residuo de cisteína (C) en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal". También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M, *et al.*, Nature Biotech 16 (1998) 677-681), por ejemplo, introduciendo una mutación Y349C o S354C en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y una mutación Y439C o E356C o S354C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento comprende la mutación Y349C o S354C y la mutación T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C o E356C o Y349C y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3. En un modo de realización preferente, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación S354C adicional en el otro dominio CH3 que forma un puente disulfuro intercatenario) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). En un modo de realización preferente, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones S354C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación S354C adicional en el otro dominio CH3 que forma un puente disulfuro intercatenario) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Pero también se pueden usar de forma alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botón en ojal, como se describe por el documento EP 1 870 459 A1. Por tanto, otro ejemplo para el anticuerpo biespecífico son las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

En otro modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" y,



adicionalmente, las mutaciones R409D, K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K, E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

5 En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y, adicionalmente, las mutaciones R409D, K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K, E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

10 En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones S354C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones S354C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y, adicionalmente, las mutaciones R409D, K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K, E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

15 Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento contiene seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que contribuyen en diversos grados a la afinidad del sitio de unión por su antígeno. Existen tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las CDR y regiones marco (FR) se determina por comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en las que esas regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias.

20 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo no se une específicamente al FcRn humano. En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo además se une específicamente a la proteína A estafilocócica.

25 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo no se une específicamente al FcRn humano. En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo además no se une específicamente a la proteína A estafilocócica.

30 En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido comprende además las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V ("ojal") y el segundo polipéptido comprende las mutaciones S354C y T366W ("botón").

35 En un modo de realización de todos los aspectos, el primer polipéptido comprende además las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V ("ojal") y el segundo polipéptido comprende las mutaciones Y349C y T366W ("botón").

40 En un modo de realización de todos los aspectos, los polipéptidos de la región Fc son de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden además las mutaciones L234A y L235A. En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden además la mutación P329G.

45 En un modo de realización de todos los aspectos, los polipéptidos de la región Fc son de la subclase IgG4 humana. En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden además las mutaciones S228P y L235E. En un modo de realización, el primer polipéptido de la región Fc y el segundo polipéptido de la región Fc comprenden además la mutación P329G.

50 El anticuerpo como se informa en el presente documento se produce por medios recombinantes. Por tanto, un aspecto como se informa en el presente documento es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo como se informa en el presente documento y otro aspecto es una célula que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo como se informa en el presente documento. Son conocidos ampliamente en el estado de la técnica procedimientos para la producción recombinante y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el aislamiento posterior del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos como se ha mencionado anteriormente en una célula huésped, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas (modificadas) respectivas se insertan en vectores de expresión por procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante de cultivo o células después de la lisis). Son bien conocidos en el estado de la técnica procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202, Geisse, S., *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282, Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160, y Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

60 En el presente documento se informa de un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento, que comprende las etapas de

65 b) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican el

anticuerpo,

c) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis del anticuerpo, y

5 d) recuperar el anticuerpo del cultivo.

En un modo de realización, la etapa de recuperación en c) incluye el uso de un reactivo de captura específico del dominio constante de cadena ligera (que, por ejemplo, es específico para la cadena ligera constante kappa o lambda, dependiendo de si una cadena ligera kappa o lambda está contenida en el anticuerpo biespecífico). En un modo de  
10 realización, este reactivo de captura específico de cadena ligera se usa en un modo de unión y elución. Los ejemplos de dichos reactivos de captura específicos del dominio constante de cadena ligera son, por ejemplo, KappaSelect™ y LambdaFabSelect™ (disponibles de GE Healthcare/BAC), que se basan en una matriz de base de agarosa altamente rígida que permite altos caudales y baja contrapresión a gran escala. Estos materiales contienen un ligando que se une a la región constante de la cadena ligera kappa o lambda, respectivamente (es decir, los fragmentos que carecen de la  
15 región constante de la cadena ligera no se unirán). Por lo tanto, ambas se pueden unir a otras moléculas diana que contienen la región constante de la cadena ligera, por ejemplo, IgG, IgA e IgM. Los ligandos se unen a la matriz por medio de un largo brazo espaciador hidrófilo para que estén fácilmente disponibles para unirse a la molécula diana. Se basan en un fragmento de anticuerpo monocatenario que se criba para detectar Ig kappa o bien lambda humana.

20 En un modo de realización, la etapa de recuperación en c) incluye el uso de un reactivo de captura específico de la región Fc. En un modo de realización, el reactivo de captura específico de la región Fc se usa en un modo de unión y elución. Los ejemplos de dichos reactivos de captura específicos de la región Fc son, por ejemplo, materiales de cromatografía de afinidad basados en la proteína A de *Staphylococcus*.

25 Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (proteína A-Sepharose o KappaSelect™, LambdaFabSelect™), cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel o diálisis.

El ADN y el ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Los linfocitos B o las células de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células huésped tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen  
30 proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

35 Algunas de las moléculas como se informa en el presente documento facilitan el aislamiento/purificación al comprender regiones Fc que se modifican diferencialmente, en las que al menos una de las modificaciones da como resultado i) una afinidad diferencial de la molécula por la proteína A (estafilocócica) y ii) una afinidad diferencial de la molécula por el FcRn humano, y la molécula se puede aislar de una célula alterada, de un medio o de una mezcla de moléculas en base a su afinidad por la proteína A.

La purificación de los anticuerpos se realiza para eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, centrifugación por gradiente de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien  
45 conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F., *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987)). Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

55 Un aspecto como se informa en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo como se informa en el presente documento. Otro aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un anticuerpo como se informa en el presente documento para la fabricación de una formulación farmacéutica. Otro aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la fabricación de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo como se informa en el presente documento. En otro aspecto, se proporciona una formulación, por ejemplo, una formulación farmacéutica, que contiene un anticuerpo como se informa en el presente documento, formulado conjuntamente con un vehículo farmacéutico.

65 Una formulación de la presente invención se puede administrar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto como se informa en el presente documento mediante

determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tampón salinas y acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

Se pueden usar muchos modos posibles de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, la aplicación intraocular o la aplicación tópica. En un modo de realización, la aplicación es intraocular e incluye, pero no se limita a, inyección subconjuntival, inyección intracanalicular, inyección en la cámara anterior por medio del limbo temporal, inyección intraestromal, inyección intracorneal, inyección subretiniana, inyección en el humor acuoso, inyección subtenoniana o dispositivo de administración mantenida, inyección intravítrea (por ejemplo, inyección vítrea anterior, media o posterior). En un modo de realización, la aplicación es tópica e incluye, pero no se limita a, colirio en la córnea.

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico o la formulación farmacéutica como se informa en el presente documento se administra por medio de aplicación intravítrea, por ejemplo, por medio de inyección intravítrea. Esto se puede realizar de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ritter *et al.*, J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276, Russelakis-Carneiro *et al.*, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206, y Wray *et al.*, Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185).

En algunos modos de realización, los kits terapéuticos como se informa en el presente documento pueden contener una o más dosis de un anticuerpo (biespecífico) presente en una formulación farmacéutica descrita en el presente documento, un dispositivo adecuado para la inyección intravítrea de la formulación farmacéutica, y una instrucción que detalla los sujetos adecuados y los protocolos para llevar a cabo la inyección. En estos modos de realización, las formulaciones se administran típicamente al sujeto que necesita tratamiento por medio de inyección intravítrea. Esto se puede realizar de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ritter *et al.*, J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276, Russelakis-Carneiro *et al.*, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206, y Wray *et al.*, Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185).

Las formulaciones también pueden contener adyuvantes, 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, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las formulaciones. Además, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos como se informa en el presente documento, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las formulaciones farmacéuticas como se informa en el presente documento se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden variar las concentraciones de dosificación reales de los ingredientes activos en las formulaciones farmacéuticas como se informa en el presente documento para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, formulación y modo de administración particulares, sin que sean tóxicas para el paciente. La concentración de dosificación seleccionada dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las formulaciones particulares empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las formulaciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La formulación debe ser estéril y fluida en la medida en que la formulación sea administrable mediante jeringuilla. Además del agua, el vehículo es preferentemente una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la formulación.

La formulación puede comprender una formulación oftálmica de liberación lenta que comprende un agente activo para administración subconjuntival. La formulación oftálmica de liberación lenta comprende micropartículas de agente activo esencialmente puro, por ejemplo, el anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento. Las micropartículas que comprenden el anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento se pueden incorporar en un polímero farmacéuticamente aceptable biocompatible o un agente de encapsulación de lípidos. Las formulaciones de liberación lenta se pueden adaptar para liberar todo de sustancialmente todo el material activo

durante un período prolongado de tiempo. El polímero o matriz lipídica, si está presente, se puede adaptar para degradarse lo suficiente como para que se transporte desde el sitio de administración después de la liberación de todo o sustancialmente todo el agente activo. La formulación de liberación lenta puede ser una formulación líquida, que comprende un polímero farmacéuticamente aceptable y un agente activo disuelto o dispersado. Tras la inyección, el polímero forma un depósito en el sitio de las inyecciones, por ejemplo, mediante gelificación o precipitación.

Otro aspecto de la invención es el anticuerpo biespecífico como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

Otro aspecto de la invención es la formulación farmacéutica como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

En el presente documento se informa del uso de un anticuerpo como se informa en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

Con el presente documento se indica expresamente que el término "que comprende" como se usa en el presente documento comprende el término "que consiste en". Por tanto, todos los aspectos y modos de realización que contienen el término "que comprende" se divulgan igualmente con el término "que consiste en".

## Modificaciones

En otro aspecto, una región Fc o anticuerpo como se informa en el presente documento así como de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-6 a continuación:

### 1. Afinidad de anticuerpos

En un modo de realización, la  $K_d$  se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (GE Healthcare, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un modo de realización, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas al 2 % de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación ( $k_{aso}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{dis}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{dis}/k_{aso}$  (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Si la velocidad de asociación supera  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

### 2. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por

ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describen el injerto en la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describen el "barajado de FR"); Osbourn, J. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68; y Klimka, A. *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones marco humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J., *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G., *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones marco maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones marco de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones marco derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

### 3. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 y Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459.

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígeno. Dichos animales típicamente contienen todos o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125. (Véanse también, por ejemplo, los documentos US 6.075.181 y US 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; el documento US 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; el documento US 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE®, y el documento US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1987), pp. 51-63; y Boerner, P., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en el documento US 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 y Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191.

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

### 4. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar anticuerpos como se informa en el presente documento cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R., *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37 y se describen adicionalmente,

por ejemplo, en McCafferty, J. *et al.*, Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. y Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. *et al.*, J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. *et al.*, J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472; y Lee, C.V. *et al.*, J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132.

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para determinar los fagos que se unen a los antígenos como se describe en Winter G., *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12 (1994) 433-455. El fago típicamente presenta fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths, A.D., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 725-734.

Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388. Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: los documentos US 5.750.373, y US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 y US 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

### 5. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a células que expresan uno o más de los antígenos diana. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, el documento WO 93/08829 y Traunecker, A., *et al.*, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), y la genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, el documento US 4.676.980, y Brennan, M., *et al.*, Science 229 (1985) 81-83); usar cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A., *et al.*, J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553); usar la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); y usar dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M., *et al.*, J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); y preparar anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

### 6. Variantes de región Fc y de anticuerpos

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de las regiones Fc o los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión al antígeno y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de una región Fc o un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos

que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de la región Fc o el anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

5

#### a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de región Fc o de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla a continuación bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de la cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

15

**TABLA.**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

20 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

25

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

30

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

35

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de una región Fc o anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas

propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto a la región Fc o anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas de la región Fc o anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometiéndose a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad mediante la construcción y reselección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R., *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de una región Fc o anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la propiedad biológica deseada, tal como, por ejemplo, la interacción del anticuerpo con el antígeno, se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, se puede usar una estructura cristalina de una región Fc o anticuerpo que comprende un complejo para identificar puntos de contacto. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen una región Fc o anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de la región Fc o del anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C de la región Fc o el anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero de la región Fc o el anticuerpo.

#### **b) Variantes de glucosilación**

En determinados modos de realización, se altera una región Fc o un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que la región Fc o el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a una región Fc o un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Las regiones Fc o los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado biantenarico que, en general, se une mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en una región Fc o un anticuerpo como se informa en el presente documento para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.



En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilados" o "carentes de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A., *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lee13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; el documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con desactivación génica, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con desactivación génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng., 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

A las variantes de la región Fc o de anticuerpo además se les proporcionan oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de la región Fc o el anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de la región Fc o del anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

### c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones adicionales de aminoácidos en la región Fc proporcionada en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución/mutación) en una o más posiciones aminoacídicas.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de la región Fc que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que hacen que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida de la región Fc *in vivo* es importante; sin embargo, determinadas funciones efectoras (tales como la CDC y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que la región Fc o el anticuerpo carezca de unión a Fc $\gamma$ R (de ahí que sea probable que carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinetic, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); el documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M., *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que la región Fc o el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones de la depuración/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica

(véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al.*, *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759-1769).

Las regiones Fc o los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichas variantes de la región Fc incluyen regiones Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoácidas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de la región Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de la región Fc o del anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604).

En determinados modos de realización, una variante de la región Fc o del anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o bien disminuidas), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E., *et al.*, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184.

En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al.*, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K., *et al.*, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de la región Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### **d) Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína**

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunocóncugado, como se describe con más detalle en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

#### **e) Derivados de región Fc y de anticuerpos**

En determinados modos de realización, una región Fc o anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización de la región Fc o del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos a la región Fc o al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares de la región Fc o del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado de la región Fc o del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de una región Fc o de un anticuerpo y uno o más restos no proteínicos que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a radiación. En un modo de realización, el

resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

5

#### f) Heterodimerización

Existen varios enfoques para las modificaciones en CH3 para garantizar la heterodimerización, que se describen bien, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Típicamente, en todos de dichos enfoques, el primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3 se genomanipulan ambos de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no se puede homodimerizar consigo mismo sino que se fuerza a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 genomanipulado complementario (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimerizan y no se forman homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes enfoques para una heterodimerización de cadena pesada mejorada se contemplan como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-ligera (intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfase CH1/CL) en los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención lo que reduce el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera y los productos secundarios de tipo Bence Jones.

En un modo de realización preferente de la invención (en caso de que el anticuerpo multiespecífico comprenda dominios CH3 en las cadenas pesadas), los dominios CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se pueden alterar mediante la tecnología de "botón en ojal" que se describe con detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; el documento WO 98/050431. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681, Atwell, S., *et al.* J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) e incrementa el rendimiento.

Por tanto, en un modo de realización de la invención, dicho anticuerpo multiespecífico (comprende un dominio CH3 en cada cadena pesada y) se caracteriza además por que

el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se encuentran cada uno en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo.

en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo multiespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:

i) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada,

de modo que dentro de la interfase original del dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico,

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada

y

ii) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada,

de modo que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo multiespecífico,

se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro del cual se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Preferentemente, dicho residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

Preferentemente dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del

grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran además mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo multiespecífico comprende una mutación aminoacídica T366W en el primer dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A, Y407V en el segundo dominio CH3 de la "cadena de ojal". También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), por ejemplo, introduciendo una mutación aminoacídica Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" y una mutación aminoacídica E356C o una mutación aminoacídica S354C en el dominio CH3 de la "cadena de botones".

En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo multiespecífico (que comprende un dominio CH3 en cada cadena pesada) comprende las mutaciones aminoacídicas S354C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación aminoacídica S354C adicional en un dominio CH3 y la mutación aminoacídica Y349C en el otro dominio CH3 que forma un puente disulfuro intercatenario) (numeración de acuerdo con Kabat).

Otras técnicas de modificaciones de CH3 para garantizar la heterodimerización se contemplan como alternativas de la invención y se describen por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento EP 1 870 459A1 se puede usar de forma alternativa. Este enfoque se basa en la mediante la introducción de sustituciones/mutaciones de aminoácidos cargados con la carga opuesta en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase del dominio CH3/CH3 entre ambas cadenas pesadas. Un modo de realización preferente para dicho anticuerpo multiespecífico es las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el primer dominio CH3 del (del anticuerpo multiespecífico) y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el segundo dominio CH3 del anticuerpo multiespecífico (numeración de acuerdo con Kabat).

En otro modo de realización, dicho anticuerpo multiespecífico comprende una mutación aminoacídica T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" y, adicionalmente, las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

En otro modo de realización, dicho anticuerpo multiespecífico comprende las mutaciones aminoacídicas S354C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o dicho anticuerpo multiespecífico comprende las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones aminoacídicas S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y, adicionalmente, las mutaciones aminoacídicas R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones aminoacídicas D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2013/157953 se puede usar de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica L351D. En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica L351K. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E).

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2012/058768 se puede usar de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende otra mutación aminoacídica en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo, seleccionada de a) T411 N, T411 R, T411Q, T411 K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R, o S400K F405I, F405M, F405T, F405S, F405V o F405W N390R, N390K o N390D K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E. En otro modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366V, K409F. En otro modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación aminoacídica Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366A, K409F. En otro modo de realización, el segundo dominio CH3 comprende otras mutaciones aminoacídicas K392E, T411E, D399R y S400R.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2011/143545 se puede usar de forma alternativa, por ejemplo, con la modificación aminoacídica en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2011/090762, que también usa la tecnología de botón en ojal descrita anteriormente, se puede usar de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366W y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas Y407A. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas T366Y y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas Y407T.

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es de isotipo IgG2 y el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2010/129304 se puede usar de forma alternativa.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2009/089004 se puede usar de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de K392 o N392 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución aminoacídica de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K, y más preferentemente D399K y E356K). En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución aminoacídica de K409 o R409 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), preferentemente K409D o R409D). En otro modo de realización, el primer dominio CH3 comprende además o de forma alternativa la sustitución aminoacídica de K439 y/o K370 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D)).

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2007/147901 se puede usar de forma alternativa. En un modo de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones aminoacídicas D239K, E240K y K292D.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO2007/110205 se puede usar de forma alternativa.

### 30 **Procedimientos y formulaciones recombinantes**

Las regiones Fc y los anticuerpos se pueden producir usando procedimientos y formulaciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona(n) un(os) ácido(s) nucleico(s) aislado(s) que codifica(n) una región Fc o un anticuerpo como se describe en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo como se informa en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y recuperar opcionalmente el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de una región Fc variante, el ácido nucleico que codifica la región Fc variante, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican los polipéptidos de la región Fc variante o las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523 (véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes

de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H., *et al.*, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión de la región Fc o del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L., *et al.*, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>+</sup> (Urlaub G., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

### Ensayos

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, un anticuerpo como se informa en el presente documento se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelctrotransferencia, etc.

### Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo como se informa en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteínicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (véanse los documentos US 5.208.020, US 5.416.064 y EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometil auristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse los documentos US 5.635.483, US 5.780.588 y US 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de la misma (véanse los documentos US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 y US 5.877.296; Hinman, L.M. *et al.*, Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342; y Lode, H.N. *et al.*, Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz, F. *et al.*, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. *et al.*, Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721; Nagy, A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. *et al.*, J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343; y el documento US 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo,  $Tc^{99m}$  o  $I^{123}$ , o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta, E.S. *et al.*, Science 238 (1987) 1098-1104. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari, R.V. *et al.*, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; documento US 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

### Procedimientos y formulaciones para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de su(s) antígeno(s) afín(es) en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección.

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos marcados como se informa en el presente documento. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos  $^{32}P$ ,  $^{14}C$ ,  $^{125}I$ ,  $^3H$  y  $^{131}I$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

### Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. (Ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por

ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.).

5 Determinadas SHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, se combina una SHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

10 Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

15 La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

20 Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. (ed.) (1980).

25 Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas.

30 Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

### **Procedimientos y formulaciones terapéuticos**

35 Cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

40 En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es en un modo de realización preferente un ser humano.

45 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo en la fabricación o preparación de un medicamento. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

50 En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

55 Los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo como se informa en el presente documento se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional.

60 Un anticuerpo como se informa en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen pero sin limitarse a administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales,



administración intravenosa rápida, e infusión pulsada.

Los anticuerpos como se informa en el presente documento se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consecuente con las prácticas médicas correctas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo como se informa en el presente documento (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de su respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis más bajas. La evolución de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunocombinado como se informa en el presente documento en lugar de o además de un anticuerpo como se informa en el presente documento.

#### Artículos de fabricación

En otro aspecto como se informa en el presente documento, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas con solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una formulación que es por sí misma o combinada con otra formulación eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la formulación es un anticuerpo como se informa en el presente documento. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la formulación se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una formulación contenida en el mismo, en el que la formulación comprende un anticuerpo como se informa en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una formulación contenida en el mismo, en el que la formulación comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización como se informa en el presente documento puede comprender además un prospecto del envase que indica que las formulaciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución glucosada. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunocombinado como se informa en el presente documento en lugar de o además de un anticuerpo como se informa en el presente documento.

### III. MODOS DE REALIZACIÓN ESPECÍFICOS

1. Una región Fc de la clase IgG que comprende un primer polipéptido de la región Fc variante y un segundo polipéptido de la región Fc variante,
- 5 en la que
- a) el primer polipéptido de la región Fc variante se deriva de un primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y el segundo polipéptido de la región Fc variante se deriva de un segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, con lo que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es idéntico al o diferente del
- 10 segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y
- b) el primer polipéptido de la región Fc variante difiere del segundo polipéptido de la región Fc variante en uno o más residuos de aminoácidos distintos de aquellos residuos de aminoácidos en los que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original difiere del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y
- 15 c) la región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc variante y el segundo polipéptido de la región Fc variante tiene una afinidad por un receptor Fc humano que es diferente de la de una región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a) y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a),
- 20 en la que el primer polipéptido de la región Fc o bien el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden independientemente entre sí la siguiente combinación de mutaciones:
- T307H y N434H.
- 25 2. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con el modo de realización 1, en la que el receptor Fc humano es el receptor Fc neonatal humano (FcRn) o el receptor Fc gamma III humano (FcγRIII).
3. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 2, en la que el receptor Fc humano es el receptor Fc neonatal humano.
- 30 4. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 3, en la que la afinidad de la región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc variante y el segundo polipéptido de la región Fc variante por un receptor Fc humano se incrementa o reduce en un 10 % o más determinada mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en comparación con la de una región Fc de la clase IgG que comprende el
- 35 primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a) y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a).
5. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 4, en la que al menos algunos de esos residuos de aminoácidos en los que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original difiere del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original promueven la formación de una región Fc de la clase IgG heterodimérica.
- 40 6. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 5, en la que
- 45 i) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original se selecciona del grupo que comprende
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana,
- polipéptido de la región Fc de la IgG2 humana,
- 50 - polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana,
- 55 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 60 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 65 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G,

## ES 2 749 383 T3

- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- 5 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- 10 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E,
- 15 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 20 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 25 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 30 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V,
- 35 - IgG1, IgG2 o IgG4 humana con la mutación K392D, e
- IgG3 humana con la mutación N392D,
- 40 y
- ii) el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original se selecciona del grupo que comprende
- 45 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana,
- polipéptido de la región Fc de la IgG2 humana,
- polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana,
- 50 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A,
- 55 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones S354C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones Y349C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, S354C, T366W,
- 60 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, Y349C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G,
- 65 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G,

- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366W,
- 5 - polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, S354C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, Y349C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E,
- 10 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S354C, T366W,
- 15 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones Y349C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, S354C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, Y349C, T366W,
- 20 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366W,
- 25 - polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, S354C, T366W,
- polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, Y349C, T366W,
- 30 - IgG1 humana con las mutaciones D399K, D356K y/o E357K, e
- IgG2, IgG3 o IgG4 humana con las mutaciones D399K, E356K y/o E357K.
- 35 7. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 6, en la que
  - i) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana, o
  - 40 ii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, o
  - 45 iii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, o
  - iv) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
  - 50 v) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
  - 55 vi) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana, o
  - 60 vii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, o
  - 65 viii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, o

- ix) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
- 5 x) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V.
- 10 8. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 7, en la que el primer polipéptido de la región Fc o el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden una de las siguientes combinaciones de mutaciones:
- 15 - T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
 - T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E.
- 20 9. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 8, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende, independientemente del segundo polipéptido de la región Fc, una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones:
- T307H y N434H, o
- 25 - T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
 - T307H y Q311H y E430H y N434H y M252Y y S254T y T256E,
- 30 y  
 el segundo polipéptido de la región Fc comprende independientemente del primer polipéptido de la región Fc una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones
- 35 - T307H, o  
 - T307Q, o  
 - Q311H, o
- 40 - E430H, o  
 - N434H, o
- 45 - T307H y Q311H, o  
 - T307H y E430H, o  
 - T307H y N434A, o
- 50 - T307H y N434H, o  
 - T307Q y Q311H, o  
 - T307Q y E430H, o
- 55 - T307Q y N434H, o  
 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o
- 60 - T307H y Q311H y E430H y N434H, o  
 - T307H y Q311H y E430H y N434Y, o  
 - T307Q y Q311H y E430H y N434A, o
- 65 - T307Q y Q311H y E430H y N434H, o

- T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o
- 5 - T307Q y V308P y N434Y e Y436H, o
- T307H y M252Y y S254T y T256E, o
- Q311H y M252Y y S254T y T256E, o
- 10 - E430 H y M252Y y S254T y T256E, o
- N434H y M252Y y S254T y T256E.

15 10. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 9, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende

una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- 20 - ninguna, o
- M252Y y S254T y T256E, o
- I253A y H310A y H435A, o
- 25 - H310A y H433A e Y436A,

y

una de las siguientes combinaciones de mutaciones:

- 30 - T307H y N434H, o
- T307H y Q311H y E430H y N434H,

35 y el segundo polipéptido de la región Fc comprende

una de las siguientes mutaciones o combinación de mutaciones:

- 40 - ninguna, si el primer polipéptido de la región Fc comprende al menos una mutación, o
- T307H, o
- T307Q, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la mutación T307Q, o
- 45 - Q311H, o
- E430 H, o
- 50 - N434H, o
- T307H y Q311H, o
- T307H y E430H, o
- 55 - T307H y N434A, o
- T307H y N434H, o
- T307Q y Q311H, o
- 60 - T307Q y E430H, o
- T307Q y N434H, o
- 65 - T307Q y N434A, o

- M252Y y S254T y T256E, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación M252Y y S254T y T256E de mutaciones, o
- 5 - I253A y H310A y H435A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación I253A y H310A y H435A de mutaciones, o
- H310A y H433A e Y436A, si el primer polipéptido de la región Fc no comprende únicamente la combinación H310A y H433A e Y436A de mutaciones, o
- 10 - T307H y Q311H y E430H y N434A, o
- T307H y Q311H y E430H y N434H, o
- 15 - T307H y Q311H y E430H y N434Y, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434A, o
- T307Q y Q311H y E430H y N434H, o
- 20 - T307Q y Q311H y E430H y N434Y, o
- T307Q y V308P y N434Y e Y436H.
- 25 11. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.
- 30 12. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones M252Y y S254T y T256E.
- 35 13. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y Q311H y E430H y N434H.
- 40 14. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.
- 45 15. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E y el segundo polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.
- 16. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H.
- 50 17. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, en la que el primer polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T307H y N434H y M252Y y S254T y T256E.
- 55 18. Un anticuerpo que comprende la región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17.
- 19. El anticuerpo de acuerdo con el modo de realización 18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 60 20. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 19, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
- 21. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 20, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
- 65 22. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 21, en el que el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.
- 23. Un polipéptido de fusión de la región Fc que comprende la región Fc de la clase IgG de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17.

24. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 22 o el polipéptido de fusión de la región Fc de acuerdo con el modo de realización 23.

5 25. La formulación farmacéutica de acuerdo con el modo de realización 24, en el que la formulación farmacéutica es para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

26. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 22 o el polipéptido de fusión de la región Fc de acuerdo con el modo de realización 23 para su uso como medicamento.

10 27. El anticuerpo para su uso de acuerdo con el modo de realización 26, en el que el uso es para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

28. El uso del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 22 o el polipéptido de fusión de la región Fc de acuerdo con el modo de realización 23 en la fabricación de un medicamento.

15 29. El uso de acuerdo con el modo de realización 28, en el que el uso es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad vascular ocular.

20 30. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 18 a 22 o el polipéptido de fusión de la región Fc de acuerdo con el modo de realización 23 para su uso en el tratamiento de la enfermedad vascular ocular.

#### IV. EJEMPLOS

25 Los siguientes son ejemplos de procedimientos y formulaciones como se informa en el presente documento. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

30 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance como se informa en el presente documento.

#### Procedimientos

##### Ionización por electropulverización/espectrometría de masas (ESI-EM)

35 Se desglucosilaron alícuotas de proteínas (50 µg) añadiendo 0,5 µl de N-Glycanase plus (Roche) y tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,1) para obtener un volumen de muestra final de 115 µl. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 18 h. Después, para la reducción y desnaturalización se añadieron 60 µl de TCEP 0,5 M (Pierce) en guanidina \* HCl 4 M (Pierce) y 50 µl de guanidina \* HCl 8 M. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Se desalaron las muestras por  
40 cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacrose G-25, isocrática, acetonitrilo al 40 % con ácido fórmico al 2 %). Se registraron espectros de masas de ESI (+va) en un instrumento Q-TOF (maXis, Bruker) equipado con una fuente de nano-ESI (TriVersa NanoMate, Advion). Las configuraciones de los parámetros de EM fueron como sigue: transferencia: embudo de RF, 400 Vpp; energía ISCID, 0 eV; RF multipolar, 400 Vpp; cuadrupolo: energía iónica, 4,0 eV; masa baja, 600 m/z; fuente: gas seco, 8 l/min; temperatura del gas seco, 160 °C; celda de colisión: energía de  
45 colisión, 10 eV; RF de colisión: 2000 Vpp; refrigerador de iones: RF de refrigerador de iones, 300 Vpp; tiempo de transferencia: 120 µs; almacenamiento de prepulsos, 10 µs; intervalo de barrido de m/z de 600 a 2000. Para la evaluación de los datos se usó un programa informático desarrollado internamente (MassAnalyzer).

##### Análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR) para FcRn

50 Se analizaron las propiedades de unión del anticuerpo natural y los mutantes al FcRn mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento BIAcore T100 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Este sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones moleculares. Permite un seguimiento continuo en tiempo real de las uniones ligando/analito y, por tanto, la determinación de los parámetros cinéticos en diversas  
55 configuraciones de ensayo. La tecnología SPR se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip de biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa en la superficie provocados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. Si las moléculas se unen a un ligando inmovilizado en la superficie, la masa se incrementa, en caso de una disociación, la masa disminuye. En el ensayo actual, se inmovilizó el receptor FcRn en un chip biosensor CM5 de BIAcore (GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Suecia) por medio de acoplamiento de amina a un nivel de 400 unidades de respuesta (UR). El  
60 ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente con PBS, Tween 20™ al 0,05 %, pH 6,0 (GE Healthcare Bioscience) como tampón de migración y dilución. Se inyectaron 200 nM de muestras de anticuerpos a un caudal de 50 µl/min a temperatura ambiente. El tiempo de asociación fue de 180 segundos, la fase de disociación duró 360 segundos. La regeneración de la superficie del chip se alcanzó por una inyección corta de HBS-P, pH 8,0. Se realizó la evaluación de los datos de SPR mediante comparación de la altura de señal de respuesta biológica a los 180 segundos después de la inyección y a los 300 segundos después de la inyección. Los parámetros correspondientes son el nivel máx. de UR  
65



(180 segundos después de la inyección) y la estabilidad tardía (300 segundos después del final de la inyección).

#### Análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR) para proteína A

5 El ensayo se basa en la espectroscopia de resonancia de plasmón superficial. Se inmoviliza proteína A en la superficie de un biosensor SPR. Al inyectar la muestra en las cubetas de lectura del espectrómetro SPR, forma un complejo con la proteína A inmovilizada, dando como resultado un incremento de masa en la superficie del chip del sensor y, por lo tanto, una respuesta más alta (ya que 1 UR se define como 1 pg/mm<sup>2</sup>). Después se regenera el chip del sensor disolviendo el complejo de muestra-proteína A. Las respuestas obtenidas se evalúan a continuación para la  
10 determinación de la señal alta en unidades de respuesta (UR) y el comportamiento de disociación.

Se acoplaron alrededor de 3500 unidades de respuesta (UR) de proteína A (20 µg/ml) en un chip CM5 (GE Healthcare) a pH 4,0 usando el kit de acoplamiento de amina de GE Healthcare.

15 La muestra y el tampón del sistema fueron HBS-P+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 % filtrado estéril, pH 7,4). La temperatura de la cubeta de lectura se configuró a 25 °C y la del compartimento de muestras a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de migración. A continuación, se inyectaron soluciones 5 nM de las construcciones de la muestra durante 120 segundos con un caudal de 30 µl/min, seguido de una fase de disociación de 300 segundos. A continuación, la superficie del chip del sensor se regeneró mediante dos inyecciones de 30  
20 segundos de duración de glicina-HCl pH 1,5 a un caudal de 30 µl/min. Cada muestra se midió como un triplicado.

El término "con (la) mutación IHH-AAA", como se usa en el presente documento, se refiere a la combinación de las mutaciones I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) y H435A (His435Ala) en una región de cadena pesada constante de la subclase IgG1 o IgG4 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), el término "con (la) mutación HHY-AAA",  
25 como se usa en el presente documento, se refiere a la combinación de las mutaciones H310A (His310Ala), H433A (His433Ala) e Y436A (Tyr436Ala) en una región de cadena pesada constante de la subclase IgG1 o IgG4 (numeración de acuerdo con el índice UE de Kabat), el término "con (la) mutación P329G LALA", como se usa en el presente documento, se refiere a la combinación de las mutaciones L234A (Leu234Ala), L235A (Leu235Ala) y P329G (Pro329Gly) en una región de cadena pesada constante de la subclase IgG1 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y el término "con (la) mutación SPLE", como se usa en el presente documento, se refiere a la combinación de las mutaciones S228P (Ser228Pro) y L235E (Leu235Glu), una región de cadena pesada constante de la subclase IgG4 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).  
30

#### General

35 La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los residuos de aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeran y se denominan de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).  
40

#### Técnicas de ADN recombinante

45 Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Síntesis génica

50 Los segmentos de genes deseados se ordenaron de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

#### Determinación de la secuencia de ADN

55 Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

#### Análisis de la secuencia de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencia

60 Se usaron el paquete de programa informático de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2 y el paquete Vector NT1 Advance, versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeo, análisis, anotación e ilustración de secuencia.

#### Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos descritos se usaron plásmidos de expresión para la expresión transitoria (por ejemplo, en células HEK293-F) basados en una organización de ADNc con o sin un promotor de CMV-Intrón A o bien en una organización genómica con un promotor de CMV.

5 La unidad de transcripción del gen del anticuerpo se componía de los siguientes elementos:

- sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 5',

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano,

10

- en el caso de la organización de ADNc, la secuencia de intrón A,

- una región 5' no traducida de un gen de inmunoglobulina humana,

15

- un ácido nucleico que codifica una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina,

- un ácido nucleico que codifica la cadena de anticuerpo humano (natural o con intercambio de dominios) como ADNc o bien en organización genómica con la organización de exón-intrón de inmunoglobulina,

20

- una región 3' no traducida con una secuencia señal de poliadenilación, y

- sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 3'.

Además del casete de expresión del anticuerpo, los plásmidos contenían:

25

- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*,

- un gen de  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*, y

30

- el gen de la dihidrofolato reductasa de *Mus musculus* como marcador seleccionable en células eucariotas.

Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpo se generaron mediante PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron mediante procedimientos y técnicas recombinantes conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, usando sitios de restricción únicos en los vectores respectivos. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verificaron por secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias se prepararon mayores cantidades de los plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos transformados de *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

35

#### Técnicas de cultivo celular

40

Se usaron técnicas de cultivo celular estándar como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

45

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante cotransfección transitoria de los respectivos plásmidos de expresión en células HEK293-F que crecen en suspensión como se describe a continuación.

#### **Ejemplo 1**

##### **Expresión y purificación**

50

##### Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Los anticuerpos mono-específicos y biespecíficos se generaron por transfección transitoria con los plásmidos respectivos (por ejemplo, codificando la cadena pesada y pesada modificada, así como la cadena ligera y ligera modificada correspondiente) usando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) que crecen en suspensión en un matraz agitador o bien en un fermentador agitado en un medio de expresión sin suero FreeStyle™ 293 (Invitrogen) con una mezcla de los respectivos plásmidos de expresión y 293fectin™ o fectina (Invitrogen). Para el matraz agitador de 2 l (Corning) se sembraron células HEK293-F a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en 600 ml y se incubaron a 120 rpm, con un 8 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células se transfectaron a una densidad celular de aprox.  $1,5 \times 10^6$  células/ml con aproximadamente 42 ml de una mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600  $\mu$ g de ADN plasmídico total (1  $\mu$ g/ml) que codifica la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar, y B) 20 ml de Opti-MEM con 1,2 ml de 293 fectina o fectina (2  $\mu$ l/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa, se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recogió después de 5-10 días y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o bien el sobrenadante se congeló y almacenó.

65

Purificación

5 Se purificaron anticuerpos biespecíficos de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando MabSelectSure-Sepharose™ (para mutantes que no son IHH-AAA) (GE Healthcare, Suecia) o KappaSelect-Agarose (para mutantes IHH-AAA) (GE Healthcare, Suecia), cromatografía de interacción hidrófoba usando butil-Sepharose (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia).

10 En resumen, se capturaron sobrenadantes de cultivo celular filtrados estériles en una resina MabSelectSuRe equilibrada (mutaciones que no son IHH-AAA y anticuerpos naturales) con tampón de PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4), se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con citrato de sodio 25 mM a pH 3,0. Se capturaron los mutantes IHH-AAA en una resina KappaSelect equilibrada con Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con citrato de sodio 25 mM pH 2,9. Se combinaron  
15 las fracciones de anticuerpo eluido y se neutralizaron con Tris 2 M, pH 9,0. Las mezclas de anticuerpos se prepararon para la cromatografía de interacción hidrófoba añadiendo solución de sulfato de amonio 1,6 M a una concentración final de sulfato de amonio 0,8 M y el pH se ajustó a pH 5,0 usando ácido acético. Después de equilibrar la resina de butil-Sepharose con acetato de sodio 35 mM, sulfato de amonio 0,8 M, pH 5,0, se aplicaron los anticuerpos a la resina, se lavaron con tampón de equilibrado y se eluyeron con un gradiente lineal a acetato de sodio 35 mM pH 5,0. Las  
20 fracciones que contenían anticuerpos (monoespecíficos o biespecíficos) se combinaron y purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las fracciones que contenían anticuerpos (monoespecíficos o biespecíficos) se combinaron, se concentraron en la concentración requerida usando dispositivos de ultrafiltración Vivaspín (Sartorius Stedim Biotech S.A., Francia) y se almacenaron a -80 °C.

25 Se analizaron la pureza y la integridad de los anticuerpos después de cada etapa de purificación por CE-SDS usando la tecnología microfluídica Labchip (Caliper Life Science, EE. UU.). Se prepararon cinco µl de solución de proteína para el análisis de CE-SDS usando el kit de reactivo HT Protein Express de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizó en un sistema LabChip GXII usando un chip HT Protein Express. Los datos se analizaron  
30 usando el programa informático LabChip GX.

El contenido agregado de las muestras de anticuerpo se analizó por SEC de alto rendimiento usando una columna de exclusión por tamaño analítica Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia) en 2xPBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 274 mM y KCl 5,4 mM, pH 7,4) con tampón de migración a 25 °C. Se inyectaron 25 µg de proteína en la columna  
35 a un caudal de 0,75 ml/min y se eluyó en condiciones isocráticas en 50 minutos.

Ejemplo 2**Cromatografía con FcRn**

40 Acoplamiento a estreptavidina Sepharose:  
Se le añadió un gramo de estreptavidina Sepharose (GE Healthcare) al receptor biotilado y dializado y se incubó durante dos horas con agitación. Se cargó la Sepharose derivatizada receptora en una columna XK de 1 ml (GE  
45 Healthcare).

Cromatografía usando la columna de afinidad con FcRn:

Condiciones:

dimensiones de la columna: 50 mm × 5 mm

altura de lecho: 5 cm

carga: 50 µg de muestra

tampón de equilibrado: MES 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 5,5

tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, con NaCl 150 mM, ajustado a pH 8,8

elución: tampón de equilibrado 7,5 CV, en tampón de elución 30 CV a 100 %, tampón de elución 10 CV

50

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> VARIANTES DE LA REGIÓN FC CON UNIÓN AL FCRN MODIFICADA Y PROCEDIMIENTOS DE USO
- <130> P32408-WO
- <150> EP14192052.0
- 10 <151> 06/11/2014
- <160> 30
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1

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

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

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

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

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
85 90 95

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

- 25 <210> 2
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 30 <400> 2

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

<210> 3  
<211> 227  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 3

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

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

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

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

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

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

10

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

<210> 4  
<211> 223  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
<211> 227  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 225

<210> 6  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

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

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

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

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

10

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

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

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



ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
225

- 5 <210> 7
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A

<400> 7

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

- 5 <210> 8
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V
- <400> 8

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

- 5 <210> 9
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones S354C, T366W
- 15 <400> 9

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 225

- 5
- <210> 10
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10
- <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A

ES 2 749 383 T3

y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

5

ES 2 749 383 T3

<210> 11  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una L234A, L235A y las mutaciones S354C, T366W

10 <400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

195                                  200                                  205

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

Pro Gly Lys  
 225

5 <210> 12  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una mutación P329G  
 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

ES 2 749 383 T3

				165					170					175				
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
				180					185					190				
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
			195					200					205					
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
		210					215					220						
	Pro	Gly	Lys															
				225														
	<210>		13															
	<211>		227															
5	<212>		PRT															
	<213>		Secuencia artificial															
	<220>																	
10	<223>		polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y la mutación P329G															
	<400>		13															
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly		
	1				5					10					15			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
				20					25					30				
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
			35					40					45					
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
		50					55					60						
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
	65					70					75					80		
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
					85					90					95			
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile		
				100					105					110				
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
			115					120					125					
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		





ES 2 749 383 T3

100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

- 5 <210> 15
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con una mutación P329G y la mutación S354C, T366W
- <400> 15

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

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

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

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

15

```

65                70                75                80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Pro Gly Lys  
225

- 5 <210> 16
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G e Y349C, T366S, L368A, Y407V
  
- <400> 16

```

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

```

```

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

```

```

15 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

```

ES 2 749 383 T3

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

<210> 17

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G y las mutaciones S354C, T366W

<400> 17

ES 2 749 383 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Pro Gly Lys  
225

5 <210> 18  
<211> 229

ES 2 749 383 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P y L235E

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

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

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

ES 2 749 383 T3

Leu Ser Leu Gly Lys  
225

5 <210> 19  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y la mutación P329G

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

5 <210> 20  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S354C, T366W  
 <400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15



ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 21

<211> 229

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

5 <210> 22  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E y las mutaciones S354C, T366W

<400> 22

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

- 5 <210> 23
- <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V

<400> 23

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

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

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

- 15 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
225

- 5 <210> 24
- <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una mutación P329G

<400> 24

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

- 5 <210> 25
- <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una P239G y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V
- <400> 25

ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
225

<210> 26  
5 <211> 229  
<212> PRT

ES 2 749 383 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una P329G y las mutaciones S354C, T366W

5

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 383 T3

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

- 5 <210> 27
- <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E, P329G y las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V
- <400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

15



ES 2 749 383 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

- <210> 28
- 5 <211> 229
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> polipéptido de la región Fc derivada de la región Fc de la IgG4 humana con una S228P, L235E, P329G y las mutaciones S354C, T366W
- <400> 28

ES 2 749 383 T3

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

- 5 <210> 29
- <211> 105
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

ES 2 749 383 T3

<400> 29

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

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

5

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 30

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

15

## REIVINDICACIONES

1. Una región Fc de la clase IgG que comprende un primer polipéptido de la región Fc variante y un segundo polipéptido de la región Fc variante,

5 en la que

a) el primer polipéptido de la región Fc variante se deriva de un primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original y el segundo polipéptido de la región Fc variante se deriva de un segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, con lo que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es idéntico al o diferente del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y

10

b) el primer polipéptido de la región Fc variante difiere del segundo polipéptido de la región Fc variante en uno o más residuos de aminoácidos distintos de aquellos residuos de aminoácidos en los que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original difiere del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original, y

15

c) la región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc variante y el segundo polipéptido de la región Fc variante tiene una afinidad por un receptor Fc humano que es diferente de la de una región Fc de la clase IgG que comprende el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a) y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original de a),

20

en la que el primer polipéptido de la región Fc o bien el segundo polipéptido de la región Fc o ambos polipéptidos de la región Fc comprenden independientemente entre sí la siguiente combinación de mutaciones:

25 - T307H y N434H.

2. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el receptor Fc humano es el receptor Fc neonatal humano.

3. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que esos residuos de aminoácidos en los que el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original difiere del segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original promueven la formación de una región Fc de la clase IgG heterodimérica.

30

4. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que

35

i) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original se selecciona del grupo que comprende el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG2 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, la IgG1, IgG2 o IgG4 humana con las mutaciones K392D, y la IgG3 humana con la mutación N392D,

40

y

ii) el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original se selecciona del grupo que comprende el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG2 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, el polipéptido de la

55

60

65

región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones P329G, S354C, T366W, el polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, S354C, T366W, la IgG1 humana con las mutaciones D399K, D356K y/o E357K, y la IgG2, IgG3 o IgG4 humana con las mutaciones D399K, E356K y/o E357K.

- 5 5. La región Fc de la clase IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que
- i) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana, o
- 10 ii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, o
- 15 iii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, o
- 20 iv) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
- 25 v) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
- vi) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana, o
- 30 vii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, o
- 35 viii) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, o
- 40 ix) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
- 45 x) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, S354C, T366W y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V, o
- 50 xi) el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1, IgG2 o IgG4 humana con la mutación K392D o el primer polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG3 humana con la mutación N392D y el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG1 humana con las mutaciones D399K, D356K y/o E357K o el segundo polipéptido de la región Fc de la clase IgG original es un polipéptido de la región Fc de la IgG2, IgG3 o IgG4 humana con las mutaciones D399K, E356K y/o E357K.
- 55 6. Un anticuerpo que comprende la región Fc de la clase IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 60 8. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
- 65 10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.

11. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
- 5 12. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la formulación farmacéutica es para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.
13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para su uso como medicamento.
- 10 14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el uso es para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.
15. El uso del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 en la fabricación de un medicamento.
- 15

Figura 1

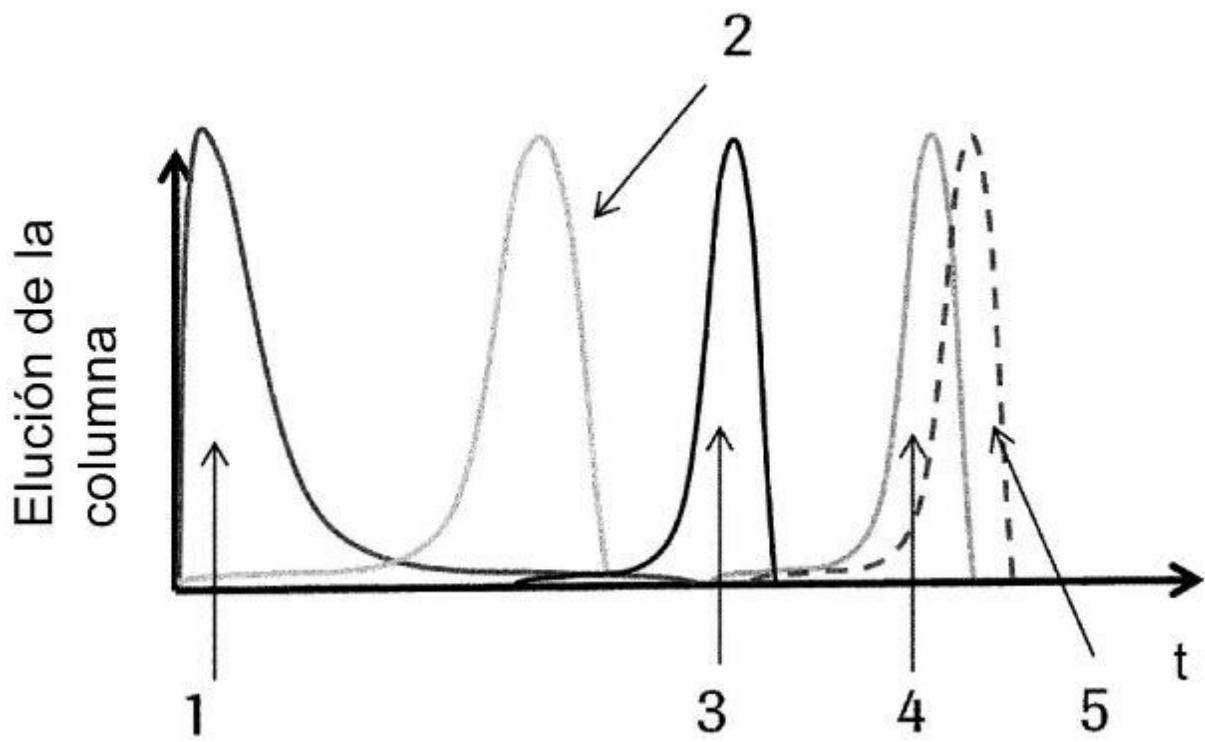


Figura 2

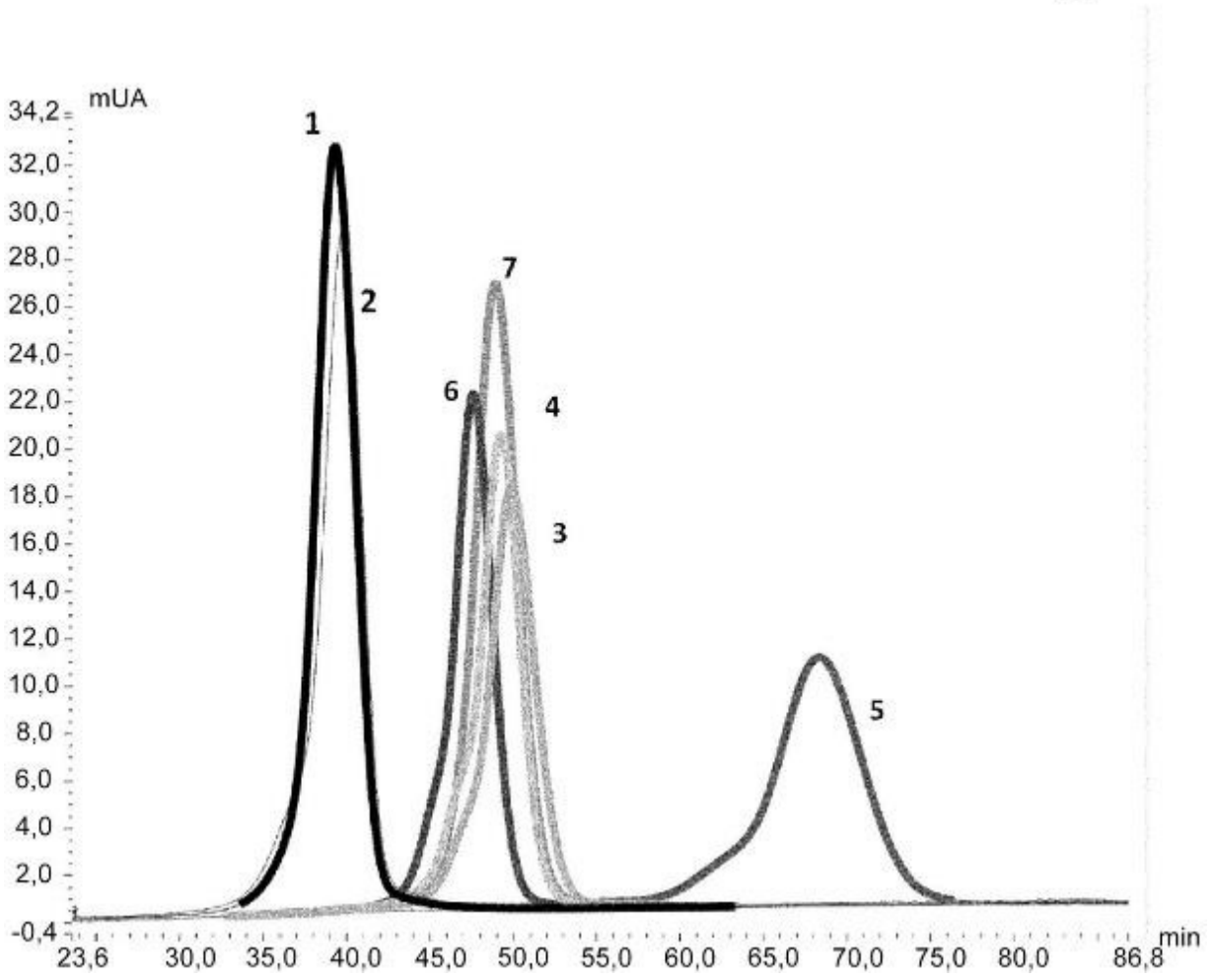




Figura 3

