

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 121**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2010** **PCT/US2010/051831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011** **WO11044368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2010** **E 10822699 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2486141**

54 Título: **Polipéptidos que contienen región Fc que presentan una función efectora mejorada debido a alteraciones del grado de fucosilación, y métodos para su uso**

30 Prioridad:

07.10.2009 US 249510 P

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

12.06.2018

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S.;
RAINEY, GODFREY JONAH ANDERSON;
LERNER, LAURA y
GORLATOV, SERGEY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 672 121 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

Polipéptidos que contienen región Fc que presentan una función efectora mejorada debido a alteraciones del grado de fucosilación, y métodos para su uso

1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 61/249.510 (presentada el 7 de octubre de 2009).

2. Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos que contienen región Fc que presentan función efectora mejorada debido a alteraciones del grado de fucosilación, y se describen en el presente documento métodos de uso de tales polipéptidos para tratar o prevenir cáncer y otras enfermedades. Los polipéptidos que contienen región Fc son preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), en las que la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácido en relación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de una región Fc de tipo natural, y que es suficiente para atenuar la fucosilación postraducciona y mediar en una unión mejorada a un receptor de Fc activante y una unión reducida a un receptor de Fc inhibidor.

Los métodos descritos son particularmente útiles en la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una infección en donde se desea una eficacia potenciada de una función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa. Los métodos descritos son también de uso en la potenciación de la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC. A la inversa, los métodos descritos son particularmente útiles en la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno en el que se desea una eficacia disminuida de una función celular efectora mediada por FcγR, por ejemplo, inflamación, etc. Los métodos descritos son también por tanto de uso en la potenciación de la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos que atenúan procesos inflamatorios.

3. Antecedentes de la invención

3.1 RECEPTORES DE Fc Y SUS PAPELES EN EL SISTEMA INMUNITARIO

La interacción de complejos de anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da como resultado una amplia gama de respuestas, que oscilan entre funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis y señales inmunomoduladoras tales como regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión a ligando relacionados estructuralmente que presumiblemente median en la señalización intracelular.

Los receptores de Fc, miembros de la superfamilia génica de proteínas de inmunoglobulinas, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la porción de Fc de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor de Fc. Los receptores de Fc se definen por su especificidad para subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fc para IgG se denominan FcγR, para IgE como FcεR, y para IgA como FcαR. Diferentes células auxiliares llevan receptores de Fc para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares estarán implicadas en una respuesta dada (revisado por Ravetch J.V. *et al.* 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. *et al.* 2001 Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. *et al.* 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. *et al.* 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. *et al.*, 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fc, las células que los expresan, y su especificidad de isotipo se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ª ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York.

Receptores de Fcγ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína de membrana integral, que presenta dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulinas, un dominio que atraviesa una sola vez la membrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Hay tres FcγR conocidos, designados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) y FcγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgen de un progenitor común, quizá por duplicación génica.

FcγRII(CD32)

Las proteínas FcγRII son glicoproteínas de membrana integrales de 40 KDa que se unen sólo a la IgG complejada debido a una baja afinidad por Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el FcγR más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII tiene sólo dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y por tanto una afinidad mucho menor por IgG que FcγRI. Hay tres genes de FcγRII humanos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Distintas diferencias dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular conduciendo a activación celular tal como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibiendo la activación de células B.

Señalización a través de FcγR

Tanto las señales activantes como inhibitoras se transducen a través de los FcγR tras la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplasmáticos del receptor denominados motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (*immunoreceptor tyrosine based activation motifs* (ITAM)) o motivos inhibitoras basados en tirosina de inmunorreceptor (*immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs* (ITIM)) explican las respuestas diferentes. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM sólo incluyen FcγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA por medio de complejos inmunitarios o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar los ITAM junto con cinasas asociadas a receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para Syk cinasa, cuya activación da como resultado la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI_3K). La activación celular conduce a liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen de FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es idéntico en un 96% a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define la subclase inhibitora de FcγR. Recientemente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se une con un FcγR activante, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, impidiendo en consecuencia el flujo de entrada de Ca^{++} intracelular. Por tanto, la reticulación de FcγRIIB atenúa la respuesta de activación a la ligación de FcγR e inhibe la receptividad celular. Por tanto se suprime la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos.

3.2 ENFERMEDADES DE RELEVANCIA**3.2.1 CÁNCER**

Una neoplasia, o tumor, es una masa neoplásica que resulta del crecimiento celular no controlado anómalo que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos permanecen generalmente localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligno" significa generalmente que el tumor puede invadir y destruir estructuras corporales vecinas y diseminarse a sitios lejanos provocando la muerte (para una revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y comportarse de manera diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en la que se originan y luego se diseminan a otra(s) parte(s) del cuerpo donde comienzan un nuevo crecimiento y provocan más destrucción.

Más de 1,2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y si la tendencia actual continúa, se espera que el cáncer sea la causa principal de muerte hacia el año 2010. El cáncer de pulmón y próstata son los cánceres que matan a más hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y mama son los cánceres que matan a más mujeres en los Estados Unidos. A uno de cada dos hombres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento de su vida. A una de cada tres mujeres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento de su vida.

Aún está por encontrarse una cura para el cáncer. Las opciones de tratamiento actuales, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación, son a menudo ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

Terapia contra el cáncer

Actualmente, la terapia contra el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para erradicar células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., capítulo 12, sección IV). Recientemente, la terapia contra el cáncer también podría implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todos estos enfoques suponen desventajas significativas para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Adicionalmente, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La radioterapia es sólo eficaz cuando el tejido neoplásico presenta una sensibilidad mayor a la radiación que el tejido normal, y la radioterapia puede provocar también a menudo efectos secundarios graves. La terapia hormonal se administra pocas veces como único agente y aunque puede ser eficaz, se usa a menudo para prevenir o retrasar la recaída del cáncer tras haber eliminado otros tratamientos la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias están limitadas en número y pueden producir efectos secundarios tales como exantemas o hinchazones, síntomas similares a la gripe, incluyendo fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tubo digestivo o reacciones alérgicas.

Con respecto a la quimioterapia, hay una variedad de agentes quimioterápicos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de los agentes quimioterápicos contra el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, o bien directamente, o bien indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótido trifosfato, para prevenir la replicación del ADN y la división celular concomitante (véase, por ejemplo, Gilman *et al.*, Goodman y Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, octava ed. (Pergamon Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, antimetabolitos, tales como metotrexato e hidroxurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, etc., aunque no son necesariamente específicos del ciclo celular, destruyen células durante la fase S debido a su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente colchicina y los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el ensamblaje de microtúbulos dando como resultado detención mitótica. Los protocolos de quimioterapia implican generalmente la administración de una combinación de agentes quimioterápicos para aumentar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterápicos, la quimioterapia tiene muchas desventajas (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., cap. 12, secc. 10). Casi todos los agentes quimioterápicos son tóxicos, y la quimioterapia provoca efectos secundarios significativos, y a menudo peligrosos, incluyendo náuseas graves, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. Adicionalmente, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterápicos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterápicos. De hecho, las células resistentes a los agentes quimioterápicos particulares usados en el protocolo de tratamiento demuestran a menudo ser resistentes a otros fármacos, incluso los agentes que actúan mediante mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos usados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina fármaco pleiotrópico o resistencia a múltiples fármacos. Por tanto, debido a la resistencia a fármacos, muchos cánceres no responden a los protocolos de tratamiento quimioterápicos convencionales.

Hay una necesidad significativa de tratamientos alternativos contra el cáncer, particularmente para el tratamiento de cáncer que no responde a tratamientos convencionales contra el cáncer, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. Una alternativa prometedora es la inmunoterapia, en la que anticuerpos específicos de antígenos cancerosos seleccionan como diana específicamente células cancerosas. Se han dirigido esfuerzos importante al aprovechamiento de la especificidad de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, la tecnología de hibridomas ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos de tumores (véase Green M.C. *et al.*, 2000 *Cancer Treat Rev.*, 26: 269-286; Weiner LM, 1999 *Semin Oncol.* 26 (supl. 14):43-51), y en los últimos pocos años, la Food and Drug Administration ha aprobado los primeros AcM para la terapia contra el cáncer: Rituxin (anti-CD20) para linfoma no Hodgkin y Herceptin [anti-(c-erb-2/HER-2)] para cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, *Breast Cancer Res.*, 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora de anticuerpos, por ejemplo, para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") es un obstáculo para tal tratamiento. Se necesitan por tanto métodos para mejorar la eficacia de tal inmunoterapia.

3.2.2 ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

La inflamación es un proceso mediante el cual los glóbulos blancos del cuerpo y productos químicos protegen el cuerpo de la infección por sustancias foráneas, tales como bacterias y virus. Se caracteriza habitualmente por dolor, hinchazón, calentamiento y enrojecimiento de la zona afectada. Productos químicos conocidos como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en un orden y cascada autolimitante a la sangre o tejidos afectados. Esta liberación de productos químicos aumenta el flujo de sangre a la zona de lesión o infección, y puede dar como resultado el enrojecimiento y calentamiento. Algunos de los productos químicos provocan una fuga de fluido a los tejidos, dando como resultado hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y provocar dolor. Estos cambios, cuando se producen durante un periodo limitado en la zona relevante, benefician al cuerpo.

En trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inflamatoria

cuando no hay sustancias foráneas contra las que luchar, y el sistema inmunitario del cuerpo normalmente protector provoca daños a sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Hay muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes modos. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con enfermedad de Crohn, y el sinovio, el hueso y el cartílago de diversas articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que los trastornos autoinmunitarios progresan, pueden resultar en la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, crecimiento anómalo de un órgano o cambios en la función orgánica. El trastorno autoinmunitario puede afectar sólo a un órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, el tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

La artritis reumatoide (RA) y artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. La artritis es un término general que describe la inflamación en articulaciones. Algunos, pero no todos, tipos de artritis son el resultado de inflamación mal dirigida. Además de la artritis reumatoide, otros tipos de artritis asociada con inflamación incluyen los siguientes: artritis psoriásica, síndrome de Reiter, artritis por espondilitis anquilosante y artritis gotosa. La artritis reumatoide es un tipo de artritis crónica que se produce en las articulaciones en ambos lados del cuerpo (tal como ambas manos, muñecas o rodillas). Esta simetría ayuda a distinguir la artritis reumatoide de otros tipos de artritis. Además de afectar a las articulaciones, la artritis reumatoide puede afectar ocasionalmente a la piel, los ojos, los pulmones, el corazón, la sangre o los nervios.

La artritis reumatoide afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial y es potencialmente discapacitante. Hay aproximadamente 2,9 millones de incidencias de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Se ven afectadas de dos a tres veces más mujeres que hombres. La edad típica a la que se produce la artritis reumatoide es de entre 25 y 50. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71.000 estadounidenses jóvenes (con edades de dieciocho años y menos), afectando a seis veces más niñas que niños.

La artritis reumatoide es un trastorno autoinmunitario en el que el sistema inmunitario del cuerpo identifica inapropiadamente las membranas sinoviales que secretan el fluido lubricante de las articulaciones como foráneo. Resulta inflamación, y el cartílago y los tejidos en y alrededor de las articulaciones se dañan o se destruyen. En casos graves, esta inflamación se extiende a otros tejidos articulares y cartílago circundante, en donde puede erosionar o destruir hueso y cartílago y conducir a deformidades de las articulaciones. El cuerpo reemplaza el tejido dañado por tejido cicatricial, provocando que los espacios normales dentro de las articulaciones se estrechen y que los huesos se fusionen entre sí. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchazón, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre, y a menudo, dolor incapacitante. Algunos síntomas comunes de artritis reumatoide incluyen rigidez articular tras despertarse que dura una hora o más; hinchazón en un dedo específico o las articulaciones de la muñeca; hinchazón en el tejido blando alrededor de las articulaciones; e hinchazón en ambos lados de la articulación. La hinchazón puede producirse con o sin dolor, y puede empeorar progresivamente o permanecer igual durante años antes de progresar.

El diagnóstico de artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, incluyendo: la ubicación específica y la simetría de articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez articular por la mañana, la presencia de abultamientos y nódulos bajo la piel (nódulos reumatoides), resultados de pruebas de rayos X que sugieren artritis reumatoide, y/o resultados positivos de un análisis de sangre denominado el factor reumatoide. Muchas personas, pero no todas, con artritis reumatoide tienen el anticuerpo frente al factor reumatoide en su sangre. El factor reumatoide puede estar presente en personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades también pueden provocar que se produzca el factor reumatoide en la sangre. Esto es por lo que el diagnóstico de artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no sólo la presencia del factor reumatoide en la sangre.

El transcurso típico de la enfermedad es uno de síntomas articulares persistentes pero fluctuantes, y tras aproximadamente 10 años, el 90% de los pacientes mostrarán daño estructural en hueso y cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una enfermedad corta que desaparece completamente, y otro pequeño porcentaje tendrá una enfermedad muy grave con muchas deformidades articulares, y ocasionalmente otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio provoca erosión o destrucción del hueso y el cartílago en las articulaciones. En artritis reumatoide, hay un ciclo autoinmunitario de presentación de antígenos, estimulación de células T, secreción de citocinas, activación de células sinoviales y destrucción articular persistentes. La enfermedad tiene un impacto importante tanto en el individuo como en la sociedad, provocando dolor significativo, función alterada y discapacidad, así como costando millones de dólares en gastos de atención sanitaria y salarios perdidos. (Véase, por ejemplo, el sitio web de NIH y el sitio web de NIAID).

La terapia disponible actualmente para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis es

habitualmente medicamentos antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los “fármacos de segunda línea” incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes experimentan remisión en estas líneas de tratamiento solas. Avances recientes en la comprensión de la patogenia de la artritis reumatoide han conducido al uso de metotrexato en combinación con anticuerpos frente a citocinas o receptores solubles recombinantes. Por ejemplo, se han usado receptores solubles recombinantes para factor de necrosis tumoral (TNF)- α en combinación con metotrexato en el tratamiento de artritis. Sin embargo, sólo aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α tales como receptores solubles recombinantes para TNF- α muestran mejora clínicamente significativa. Muchos pacientes siguen siendo resistentes a pesar del tratamiento. Sigue habiendo todavía problemas de tratamiento difíciles para pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden prevenir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta la fecha, ningún tratamiento es ideal, y no hay cura. Se necesitan agentes terapéuticos novedosos que traten más eficazmente la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios.

3.2.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los agentes infecciosos que provocan enfermedad pertenecen a cinco grupos: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (gusanos). La notable variedad de estos patógenos ha provocado la selección natural de dos características cruciales de la inmunidad adaptativa. En primer lugar, la ventaja de poder reconocer una amplia gama de diferentes patógenos ha impulsado el desarrollo de receptores sobre células T y B de igual o mayor diversidad. En segundo lugar, los distintos hábitats y ciclos de vida de los patógenos tienen que contrarrestarse mediante una gama de distintos mecanismos efectores. Los rasgos característicos de cada patógeno son su modo de transmisión, su mecanismo de replicación, su patogenia o los medios mediante los cuales provoca la enfermedad, y la respuesta que provoca.

El registro de la muerte y el padecimiento humanos provocados por la viruela, el cólera, el tifus, la disentería, la malaria, etc. establece el renombre de las enfermedades infecciosas. A pesar de los destacados éxitos en el control proporcionados por las condiciones higiénicas mejoradas, la inmunización y la terapia antimicrobiana, las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema común y significativo de la medicina moderna. La enfermedad más común de la humanidad, el resfriado común, es una enfermedad infecciosa, así como la temida enfermedad moderna SIDA. Algunas enfermedades neurológicas crónicas que se pensaba anteriormente que eran enfermedades degenerativas se ha demostrado que son infecciosas. Hay pocas dudas de que el futuro seguirá revelando las enfermedades infecciosas como problemas médicos importantes.

Un enorme número de enfermedades humanas y animales resultan de infecciones virulentas y oportunistas de cualquiera de los agentes infecciosos mencionados anteriormente (véase Belshe (Ed.) 1984 Textbook of Human Virology, PSG Publishing, Littleton, MA).

Una categoría de enfermedades infecciosas son infecciones virales, por ejemplo. Las enfermedades virales de una amplia gama de tejidos, incluyendo el aparato respiratorio, el SNC, la piel, el aparato genitourinario, los ojos, los oídos, el sistema inmunitario, el aparato gastrointestinal y el sistema musculoesquelético, afectan a un gran número de seres humanos de todas las edades (véase la tabla 328-2 en: Wyngaarden y Smith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 1750-1753). Aunque se ha invertido un considerable esfuerzo en el diseño de terapias antivirales eficaces, las infecciones virales siguen amenazando las vidas de millones de personas en todo el mundo. En general, los intentos de desarrollar fármacos antivirales se han centrado en varios estadios del ciclo de vida viral (véase por ejemplo, Mitsuya *et al.*, 1991, FASEB J. 5:2369-2381, que comentan VIH). Sin embargo, una desventaja común asociada con el uso de muchos fármacos antivirales actuales son sus efectos secundarios perjudiciales, tales como toxicidad para el huésped o resistencias por determinadas cepas virales.

El documento WO 2009/016164 A1 (Glaxo Groupo Ltd.; 2009) da a conocer anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen específicamente a receptor de factor de crecimiento similar a la insulina humano (hIGF-1R).

El documento US 2005/0054832 A1 (Lazar *et al.*; 2005) da a conocer la combinación de variantes de Fc con glicoformas modificadas por ingeniería genética.

Kanda *et al.* (2006) Glycobiology, 17(1):104-118, se refiere a la generación de anticuerpos frente a IgG1 humana que carece de fucosa central con tres oligosacáridos de Fc unidos a N diferentes (de tipo con alto contenido en manosa, híbrido y complejo) usando el mismo clon de producción y a la comparación de sus actividades.

El documento WO 2007/041635 A2 da a conocer variantes de Fc que comprenden glicoformas modificadas por ingeniería genética en el que una glicoforma modificada por ingeniería genética se define como una composición de hidratos de carbono unida covalentemente a una IgG.

4. Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una sustitución de aminoácido en una región Fc de IgG humana para atenuar la fucosilación postraducciona de la región Fc de IgG humana según la reivindicación 1 en el presente documento.

- 5 Se describen métodos de tratamiento o prevención de cáncer y otras enfermedades, trastornos e infecciones usando moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyendo inserciones o deleciones) en una o más regiones, modificación/modificaciones que altera(n) (en relación con una región Fc de tipo natural) la razón de afinidades de la
 10 región Fc variante con respecto a un FcγR activante (tal como FcγRIIA o FcγRIIA) en relación con un FcγR inhibidor (tal como FcγRIIB):

$$\text{Razón de afinidades} = \frac{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{activante}}}{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{inhibidor}}}$$

- 15 De particular interés son razones de afinidades en las que o bien FcγRIIA o bien FcγRIIA es el FcγR_{Activante} y FcγRIIB es el FcγR_{Inhibidor}. Cuando una variante de Fc tiene una razón de afinidades mayor de 1, los métodos de la invención tienen uso particular para proporcionar un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad, trastorno o infección, o la mejora de un síntoma del mismo, en donde se desea una eficacia potenciada de una función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Una razón de
 20 afinidades aumentada de este tipo puede resultar de la región Fc de la molécula que tiene (en relación con una Fc de tipo natural) un aumento de la afinidad por un FcγR_{Activante} (por ejemplo, FcγRIIA o FcγRIIA) acoplado con o bien una afinidad sin cambios por un FcγR_{Inhibidor} (por ejemplo, FcγRIIB) o bien una disminución de la afinidad por tal FcγR_{Inhibidor}. Alternativamente, una razón de afinidades aumentada puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta un aumento de la afinidad por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que el aumento de la afinidad por el FcγR_{Activante} exceda el aumento de la afinidad por el
 25 FcγR_{Inhibidor}, o puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una afinidad disminuida por tanto el FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que la disminución de la afinidad por el FcγR_{Activante} sea menor que la disminución de la afinidad por el FcγR_{Inhibidor}, o puede resultar de una afinidad sin cambios por un FcγR_{Activante} acoplado con una disminución de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor}.

- 30 Cuando una variante de Fv tiene una razón de afinidades menor de 1, los métodos descritos tienen uso particular para proporcionar un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o trastorno, o la mejora de un síntoma del mismo, en donde se desea una eficacia disminuida de la función celular efectora mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. Una razón de afinidades disminuida de este tipo puede resultar la región
 35 Fc de la molécula que tiene (en relación con una Fc de tipo natural) una disminución de la afinidad por un FcγR_{Activante} (por ejemplo, FcγRIIA o FcγRIIA) acoplado con o bien una afinidad sin cambios por un FcγR_{Inhibidor} (por ejemplo, FcγRIIB) o bien un aumento de la afinidad por tal FcγR_{Inhibidor}. Alternativamente, una razón de afinidades disminuida puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una disminución de la afinidad por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que la disminución de la afinidad
 40 por el FcγR_{Activante} exceda la disminución de la afinidad por el FcγR_{Inhibidor}, o puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una afinidad aumentada por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que el aumento de la afinidad por el FcγR_{Activante} sea menor que el aumento de la afinidad por el FcγR_{Inhibidor}, o puede resultar de una afinidad sin cambios por un FcγR_{Activante} acoplado con un aumento de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor}.

- 45 Los enfoques actuales para optimizar la función de la región Fc (por ejemplo, actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) en anticuerpos terapéuticos monoclonales y polipéptidos solubles fusionados con regiones Fc se han centrado en un número limitado de cambios de aminoácidos individuales basados en análisis estructural y/o diseños asistidos por
 50 ordenador. Los enfoques alternativos en la modificación por ingeniería genética de regiones Fc se han centrado en la glicosilación de la región Fc para optimizar la función de la región Fc. La validez del uso de la razón de afinidades de una variante de Fc para evaluar su potencial terapéutico se ha sugerido con respecto a variantes de Fc cuyas secuencias se derivaron usando algoritmos informáticos para buscar un espacio de secuencia-estructura (Lazar, G.A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:4005-4010 (2006)). Este enfoque identificó cuatro variantes de Fc: (1) S239D; (2) I322E; (3) S239D y I322E; y (4) S239D, I322E y A330L, todas las cuales se unían a FcγRIIA así como a FcγRIIB con mayor afinidad que el tipo natural (Lazar, G.A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:4005-4010 (2006)).
 55 En cambio, la presente invención se basa, en parte, en la selección de moléculas que contienen Fc variante deseadas que presentan una razón de afinidades alterada por FcγRIII y FcγRII, a partir de una biblioteca no sesgada de variantes de Fc. Este enfoque permitió la identificación de un universo más grande de variantes de Fc deseadas, así como variantes que tienen razones de afinidades muy en exceso de las notificadas por Lazar, G.A. *et al.* (Proc.
 60

Natl. Acad. Sci. (USA) 103:4005-4010 (2006)). Se describen en el presente documento métodos para modificar por ingeniería genética regiones Fc y la identificación y el examen de variantes de Fc novedosas fuera de las regiones esperadas identificadas mediante estudios estructurales. Las regiones esperadas tal como se usa en el presente documento se refieren a las regiones que basándose en estudios estructurales y/o bioquímicos están en contacto con un ligando de Fc.

Las moléculas terapéuticas o profilácticas que se usan según los métodos comprenden por tanto regiones Fc variantes que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que presentan una razón de afinidades alterada, especialmente en las que el FcγR_{Activante} es o bien FcγRIIA o bien FcγRIIA y el FcγR_{Inhibidor} es FcγRIIB. En una realización preferida, las moléculas se unen además específicamente a FcγRIIB (por medio de la región Fc) con una afinidad menor que una molécula comparable (es decir, que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de la invención excepto por la una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc) que comprende la región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIB. Se describen moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA y/o FcγRIIA y potencian la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. Se describen moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA y/o FcγRIIA pero que no alteran la afinidad de las regiones Fc variantes por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. Se describe una región Fc variante que tiene afinidad potenciada por FcγRIIA y FcγRIIA pero afinidad reducida por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural.

Las variantes de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, incluyendo pero sin limitarse a modificaciones que alteran la función efectora. Se describe la combinación de una variante de Fc con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferiblemente, las variantes de Fc potencian el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante de Fc se combina con un mutante que se sabe que se une a FcγRIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural; la combinación con un mutante da como resultado una potenciación de más veces de la afinidad por FcγRIIA.

En una realización, las variantes de Fc pueden combinarse con otras variantes de Fc conocidas tales como las dadas a conocer en Duncan *et al.*, 1988, Nature 332:563-564; Lund *et al.*, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund *et al.*, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre *et al.*, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis *et al.*, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund *et al.*, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis *et al.*, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund *et al.*, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour *et al.*, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie *et al.*, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy *et al.*, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie *et al.*, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta *et al.*, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; Lazar, G.A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:4005-4010 (2006); documento US 5.624.821; documento US 5.885.573; documento US 6.194.551; documento PCT WO 00/42072; documento PCT WO 99/58572; documento PCT WO 04/063351; publicación de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000; y publicación de solicitud de patente estadounidense 2005/0064514. En determinadas realizaciones, las variantes de Fc pueden combinarse con una o más de las variantes de Fc, es decir, modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo natural, presentadas en las tablas 4, 5, 9 y 10, más adelante.

Se describen moléculas que son homodímeros o heterodímeros de regiones Fc. Heterodímeros que comprenden regiones Fc se refieren a moléculas en las que las dos cadenas de Fc tienen la misma o diferente secuencia. En algunas realizaciones, en las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, cada cadena tiene una o más modificaciones diferentes con respecto a la otra cadena. En otras realizaciones, en las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, una cadena contiene la región Fc de tipo natural y la otra cadena comprende una o más modificaciones. Se conocen en la técnica métodos de modificación por ingeniería genética de moléculas que contienen Fc heterodiméricas.

Se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que se une a un FcγR_{Activante} pero no se une a un FcγR_{Inhibidor} o se une a un FcγR_{Inhibidor} con una afinidad reducida, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural, tal como se determina mediante ensayos convencionales (por ejemplo, ensayos *in vitro*) conocidos por un experto en la técnica. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que se une a un FcγR_{Inhibidor}, pero no se une a un FcγR_{Activante} o se une a un FcγR_{Activante} con afinidad reducida, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural, tal como se determina mediante ensayos convencionales (por ejemplo, ensayos *in vitro*) conocidos por un experto en la técnica. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una

modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en las que dicho FcγR es FcγIIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en las que dicho FcγR es FcγRIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en las que dicho FcγR es FcγRIIB.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas por un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR incluyendo pero sin limitarse a un ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 6.2). Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas se caracterizan también mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones celulares efectoras de mediador de FcγR (véase la sección 6.2.2). En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y dados a conocer en el presente documento) que aquellas en ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente descripción no excluye moléculas que no presentan el fenotipo deseado en ensayos basados *in vitro* pero que presentan el fenotipo deseado *in vivo*.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural y presenta una razón de afinidades mayor de 1, siempre que dicha región Fc variante no tenga únicamente una sustitución en una cualquiera de las posiciones 329, 331 ó 332, o no incluya, o no sea únicamente una sustitución de, una cualquiera de: (1) alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326 ó 430; (2) una lisina en la posición 330; (3) una treonina en la posición 339; (4) una metionina en la posición 320; (5) una serina en la posición 326; (6) una asparagina en la posición 326; (7) un ácido aspártico en la posición 326; (8) un ácido glutámico en la posición 326; (9) una glutamina en la posición 334; (10) un ácido glutámico en la posición 334; (11) una metionina en la posición 334; (12) una histidina en la posición 334; (13) una valina en la posición 334; (14) una leucina en la posición 334; (15) una lisina en la posición 335, o (16) únicamente un ácido glutámico en la posición 332; (17) únicamente un ácido glutámico en la posición 332 y un ácido aspártico en la posición 239; (18) únicamente un ácido glutámico en la posición 332, un ácido aspártico en la posición 239 y una leucina en la posición 330.

También se describe una molécula que tiene una región Fc variante de este tipo, en la que dicha región Fc variante se caracteriza adicionalmente porque presenta al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural en la posición 234, 235, 243, 247, 255, 270, 284, 292, 300, 305, 316, 370, 392, 396, 416, 419 y/o 421.

También se describen moléculas en las que las regiones Fc variantes se caracterizan adicionalmente porque presentan sustituciones en al menos las dos posiciones: (a) 235 y 243; (b) 243 y 292; (c) 243 y 300; (d) 243 y 305; (e) 243 y 396; (f) 247 y 270; (g) 247 y 421; (h) 255 y 270; (i) 255 y 396; (j) 270 y 316; (k) 270 y 396; (l) 270 y 416; (m) 270 y 421; (n) 292 y 300; (o) 292 y 305; (p) 292 y 396; (q) 300 y 396; (r) 305 y 396; (s) 316 y 416; (t) 392 y 270; (u) 392 y 396; (v) 419 y 270; o (w) 419 y 396.

También se describen moléculas en las que las regiones Fc variantes se caracterizan adicionalmente porque presentan sustituciones en al menos las tres posiciones: ((a) 243, 247 y 421; (b) 243, 292 y 300; (c) 243, 292 y 305; (d) 243, 292 y 396; (e) 243 300 y 396; (f) 243, 305 y 396; (g) 247, 270 y 421; (h) 255, 270 y 396; (i) 270, 316 y 416; (j) 270, 392 y 396; (k) 270, 396 y 419; (l) 292 300 y 396; o (m) 292, 305 y 396.

También se describen las realizaciones de tales anticuerpos en las que la al menos una modificación en el dominio Fc comprende una sustitución de L234 o una sustitución de L235, o sustituciones de tanto L234 como L235, y particularmente, en las que la sustitución de L234 es L234F y dicha sustitución en L235 es L235V.

También se describen los métodos descritos anteriormente en los que la región Fc variante presenta al menos modificaciones de aminoácidos en relación con una región Fc de tipo natural en una o más de las posiciones: 243, 292, 300 ó 396 (es decir, en la posición 243, 292, 300 ó 396; o en tanto la posición 243 como en la posición 292; o en tanto la posición 243 como en la posición 300; o en tanto la posición 243 como en la posición 396; o en tanto la posición 292 como en la posición 300; o en tanto la posición 292 como en la posición 396; o en tanto la posición 300 como en la posición 396; o en la posición 243, en la posición 292 y en la posición 300; o en la posición 243, en la posición 292 y en la posición 396; o en la posición 292, en la posición 300 y en la posición 396; o en la posición 243, en la posición 292, en la posición 300 y en la posición 396). También se describe la realización de los métodos descritos anteriormente en los que tal región Fc variante presenta las modificaciones: L234F, L235I, F243L, R292P y/o Y300L.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades mayor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de las siguientes sustituciones: (a)

F243L; (b) D270E; (c) R292G; o (d) R292P.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades mayor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de los siguientes pares de sustituciones: (a) F243L y R292P; (b) F243L y Y300L; (c) F243L y P396L; (d) D270E y P396L; (e) R292P y Y300L; (f) R292P y V305I; (g) R292P y P396L; (h) Y300L y P396L; y (i) P396L y Q419H.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades mayor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de los siguientes tríos de sustituciones: (a) F243L, P247L y N421K; (b) F243L, R292P y Y300L; (c) F243L, R292P y Y300L; (d) F243L, R292P y V305I; (e) F243L, R292P y P396L; (f) F243L, Y300L y P396L; (g) P247L, D270E y N421K; (h) R255L, D270E y P396L; (i) D270E, G316D y R416G; (j) D270E, K392T y P396L; (k) D270E, P396L y Q419H; (l) V284M, R292L y K370N o (m) R292P, Y300L y P396L.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades mayor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de las siguientes tétradas de sustituciones: (a) L234F, F243L, R292P y Y300L; (b) L235I, F243L, R292P y Y300L; (c) L235Q, F243L, R292P y Y300L; (d) F243L, R292P, Y300L y P396L; (e) F243L, P247L, D270E y N421K; (f) F243L, R255L, D270E y P396L; (g) F243L, D270E, G316D y R416G; (h) F243L, D270E, K392T y P396L; (i) F243L, D270E, P396L y Q419H; (j) F243L, R292P, V305I y P396L; (k) D270E, G316D, P396L y R416G; (l) P247L, D270E, Y300L y N421K; (m) R255L, D270E, R292G y P396L; o (n) R255L, D270E, Y300L y P396L.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades mayor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de las siguientes péntadas de sustituciones: (a) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L; (b) L235P, F243L, R292P, Y300L y P396L; (c) F243L, R292P, V305I, Y300L y P396L; o (d) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades menor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de las siguientes sustituciones: (a) P396L o (b) Y300L.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades menor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos cualquiera de los siguientes pares de sustituciones: (a) F243L y P396L; (b) P247L y N421K; (c) R255L y P396L; (d) R292P y V305I; (e) K392T y P396L; o (f) P396L y Q419H.

También se describen tales moléculas en las que las regiones Fc variantes presentan una razón de afinidades menor de 1, y en las que tales regiones Fc variantes tienen al menos las siguientes tres sustituciones: F243L, R292P y V305I.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIA, siempre que la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyan o no sean únicamente una sustitución con una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272 ó 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en posiciones que producen un contacto directo con FcγR basándose en análisis estructural y cristalográfico de interacciones Fc-FcγR tales como las dadas a conocer por Sondermann *et al.*, (2000 Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que producen un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región de bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G). En algunas realizaciones, las moléculas que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que no produce un contacto directo con un FcγR basándose en análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión a Fc-FcγR.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad alterada en relación con una

molécula que comprende una región Fc de tipo natural, siempre que dicha al menos una modificación de aminoácido no incluya o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural, siempre que dicha región Fc variante no incluya o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 y no tenga una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326 ó 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335 una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante no incluye o no es únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439 y no tiene una histidina, glutamina o tirosina en la posición 280; una serina, glicina, treonina o tirosina en la posición 290, una leucina o isoleucina en la posición 300; una asparagina en la posición 294, una prolina en la posición 296; una prolina, asparagina, ácido aspártico o valina en la posición 298; una lisina en la posición 295. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad reducida en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural siempre que dicha región Fc variante no tenga o no tenga únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439. En aún otra realización preferida, la invención abarca una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad potenciada en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 ó 430.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante no incluye una sustitución o no tiene únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269 ó 328 y no tiene una leucina en la posición 243, una asparagina en la posición 298, una leucina en la posición 241 e isoleucina o una alanina en la posición 240, una histidina en la posición 244, una valina en la posición 330 o una isoleucina en la posición 328.

En una realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En determinadas realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en más de 2 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En otras realizaciones, moléculas que comprenden una región Fc variante se unen específicamente a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad al menos el 65%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 150%, al menos el 200% mayor en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural. Tales mediciones son preferiblemente ensayos *in vitro*.

También se describen moléculas con afinidades alteradas por los receptores de Fcγ activantes y/o inhibidores. En particular, moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. También se describen moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB y también disminuyen la afinidad de las regiones Fc variantes por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. También se describen moléculas con regiones Fc variantes, que tienen una o más

modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB y también aumentan la afinidad de las regiones Fc variantes por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. También se describen moléculas con regiones Fc variantes, modificaciones que disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pero que no alteran la

- 5 afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. También se describen moléculas con regiones Fc variantes, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pero reducen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural.
- 10 En una realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), una o más modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIIA y FcγRIIB con afinidad de tipo natural. En una determinada realización, la una o más modificaciones de aminoácidos no son una sustitución
- 15 con alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333 ó 334.

- En otra realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), una o más modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB, en relación con una
- 20 molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIA y FcγRIIB con afinidad de tipo natural. En una determinada realización, la una o más modificaciones de aminoácidos no son una sustitución con arginina en la posición 320.

- En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas con afinidades alteradas por receptores activantes y/o
- 25 inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en las que dichas una o más modificaciones de aminoácidos son una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución
- 30 en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición
- 35 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición
- 40 292 con prolina, en la posición 300 con leucina y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con
- 45 leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico y en la posición 421 con lisina. En una realización relacionada, la región Fc variante comprende además una o más modificaciones de aminoácidos dadas a conocer en las tablas 4, 5, 9 y 10 más adelante.

- 50 También se describen métodos para examinar e identificar moléculas terapéuticas y/o profilácticas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) usando tecnología de presentación en la superficie de levaduras (para una revisión véase Boder y Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444). La presentación en la superficie de levaduras de los polipéptidos que contienen Fc mutante de la invención puede realizarse según cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica o
- 55 descritas en el presente documento (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351). La presentación en levaduras ofrece la ventaja de utilizar la unión real a un receptor deseado para identificar regiones Fc variantes que tienen unión potenciada a ese receptor.

- 60 También se describen métodos para examinar e identificar moléculas terapéuticas y/o profilácticas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) usando tecnología de presentación en levaduras conocida en la técnica o descrita en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-FcγR, es
- 65 decir, unión específica de una región Fc a un FcγR, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de

resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis en equilibrio. En algunas realizaciones, el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) se realizan usando la tecnología de presentación en levaduras tal como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los ensayos basados en función pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones celulares efectoras mediadas por FcγR tales como las descritas en el presente documento en la sección 6.2.2. Los ejemplos no limitativos de funciones celulares efectoras que pueden usarse según los métodos de la invención, incluyen pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. En algunas realizaciones, el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) se realizan usando la tecnología de presentación en levaduras tal como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica en combinación o en paralelo con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento.

También se describen métodos para examinar y caracterizar la interacción FcγR-Fc usando ensayos bioquímicos desarrollados por los inventores y dados a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. Los ensayos dados a conocer permiten la detección y cuantificación de la interacción FcγR-Fc, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para FcγRIIB y FcγRIIIA. El método implica la formación de un complejo de FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIB) que tiene una avidéz mejorada por una región Fc, en relación con un FcγR no complejoado.

También se describe el uso de los complejos inmunitarios formados según los métodos descritos anteriormente para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o libres de células.

En realizaciones preferidas, se caracterizan adicionalmente moléculas (por ejemplo, inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas) que comprenden las regiones Fc variantes en un modelo animal para determinar la interacción con un FcγR o en un modelo animal de estado patológico. Modelos animales preferidos para uso en los métodos son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.877.397 y 6.676.927. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones con desactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIIA humano; ratones con desactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIA humano; ratones con desactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones con desactivación de FcγRIIIA que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones con desactivación de FcγRIIIA y FcγRIIA que portan FcγRIIIA y FcγRIIA humanos; y ratones con desactivación de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB que portan FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humanos. La cepa de ratón usada para estudios de desactivación puede ser cualquier cepa consanguínea adecuada (por ejemplo, B6) tal como se determina rutinariamente en la técnica. En realizaciones preferidas, la cepa de ratón es la de un genotipo desnudo, es decir, inmunocomprometida, para permitir estudios de xenoinjerto (por ejemplo, modelos de cáncer). Tales cepas desnudas incluyen, pero no se limitan a FoxN1 y N/N. En otras realizaciones los ratones que portan uno más FcγR humanos comprenden además una o más mutaciones genéticas adicionales incluyendo una o más desactivaciones, por ejemplo RAG1 -/-.

También se describen inmunoglobulinas modificadas que comprenden una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Tales inmunoglobulinas incluyen moléculas de IgG que contienen de manera natural regiones de unión a FcγR (por ejemplo, regiones de unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB), o derivados de inmunoglobulina que se han modificado por ingeniería genética para contener una región de unión a FcγR (por ejemplo, regiones de unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Las inmunoglobulinas modificadas incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferiblemente, de manera inmuno-específica, es decir, elimina por competencia la unión no específica tal como se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para someter a ensayo la unión antígeno-anticuerpo específica, a un antígeno y contiene una región de unión a FcγR (por ejemplo, una región de unión a FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multispecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, de cadenas sencillas, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos por disulfuro y fragmentos que contienen o bien un dominio VL o bien uno VH o incluso una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en determinados casos, se modifica por ingeniería genética para contener o se fusiona a una región de unión a FcγR.

También se describen inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA de manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. La función efectora de las moléculas puede

someterse a ensayo usando cualquier ensayo descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen una actividad de ADCC potenciada en relación con el tipo natural en al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces.

5 También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de uno o más residuos de aminoácido, modificaciones que modulan la afinidad del anticuerpo terapéutico por un receptor FcγR activante y/o un receptor FcγR inhibidor. También se describe la
10 modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante modificación de uno o más residuos de aminoácido, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante modificación de uno o más residuos de aminoácido,
15 modificación que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y disminuye además la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Los anticuerpos terapéuticos modificados por ingeniería genética pueden tener además una función efectora potenciada, por ejemplo, actividad de ADCC potenciada, actividad de fagocitosis, etc., tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

20 También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo monoclonal específico para el protooncogén Her2/neu (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31) (por ejemplo, anticuerpo 4D5 tal como se da a conocer en Carter *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9; patente estadounidense n.º 5.677.171; o publicación de solicitud de patente internacional WO 01/00245) mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos un residuo de aminoácido, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc por
25 FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal frente a Her2/neu humanizado puede disminuir también adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, los anticuerpos humanizados monoclonales modificados por ingeniería genética específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento. En una
30 determinada realización, el anticuerpo 4D5 es quimérico. En otra realización, el anticuerpo 4D5 está humanizado. En una realización específica, el anticuerpo 4D5 que va a modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32. En otra realización específica, el anticuerpo 4D5 que va a modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33. En todavía otras realizaciones, el
35 anticuerpo 4D5 que va a modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos está humanizado y comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34. En realizaciones adicionales, el anticuerpo 4D5 que va a modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos está humanizado y comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 35.

40 En una realización específica, los anticuerpos de la invención se unen a Her2/neu. Los anticuerpos anti-Her2/neu pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 36) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 37) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 38) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 39) y/o una CDR2 (SEQ ID NO: 40) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 41).

45 También se describe un anticuerpo 4D5 (por ejemplo, quimérico, humanizado) que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina. En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una
50 leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305 y una leucina en la posición 396. En otras realizaciones, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina. En otras realizaciones, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292 y una leucina en la posición 300. En otras realizaciones, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que
55 comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico y en la posición 421 con lisina. En otra realización, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292 y una lisina en la posición 421.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-CD20 mediante modificación (por
60 ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos un residuo de aminoácido, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En una realización relacionada, el anticuerpo anti-CD20 es anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico de ratón y ser humano, 2H7. Se dan a conocer además ejemplos no limitativos de anticuerpos anti-CD20 que pueden usarse en los métodos de la invención en la solicitud de patente estadounidense n.º 11/271.140, presentada el 10 de noviembre de 2005. En otra realización específica, la
65 modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7, también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la

región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado por ingeniería genética, 2H7, puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento.

- 5 También se describe un anticuerpo 2H7 (por ejemplo, quimérico, humanizado) que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina. En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo 2H7 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305 y una leucina en la posición 396. En otras realizaciones, la invención abarca un anticuerpo 4D5 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo 2H7 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292 y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo 2H7 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo 2H7 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292 y una lisina en la posición 421.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB, en particular un anticuerpo anti-FcγRIIB que se une específicamente a FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Se dan a conocer ejemplos no limitativos de anticuerpos anti-FcγRIIB representativos en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/403.266 presentada el 12 de agosto de 2002; solicitud estadounidense n.º 10/643.857 presentada el 14 de agosto de 2003; y publicación de solicitud de patente estadounidense n.ºs: 2004-0185045; 2005-0260213; y 2006-0013810. Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB que pueden modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos son los anticuerpos monoclonales producidos por los clones 2B6, 3H7, 8B5.4.3, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, 8B5 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, PTA-7610 y PTA-5959, respectivamente (depositados ante la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011 o versiones quiméricas, humanizadas u otras de los mismos).

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende las CDR de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo 2B6 humanizado que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo 2B6 humanizado que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo 2B6 humanizado que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo 2B6 humanizado que comprende una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que contiene la secuencia SEQ ID NO: 30. También se describe el uso del plásmido pMGx0675, que incluye las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 que codifican para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 29 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID NO: 30, respectivamente. El plásmido pMGx0675 se había depositado ante la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 23 de mayo de 2006 según lo dispuesto en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, y al que se le asignó el número de registro PTA 7609.

También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos, preferiblemente humanizados, que se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. Los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 tal como se expone en SEQ ID NO: 3) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 tal como se expone en SEQ ID NO: 3) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 100-111 tal como se expone en SEQ ID NO: 2, o una

secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 100-111 tal como se expone en SEQ ID NO: 3) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 24-34 tal como se expone en SEQ ID NO: 8) y/o una CDR2 (SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-56 tal como se expone en SEQ ID NO: 62) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 90-98 tal como se expone en SEQ ID NO: 8).

También se describe un anticuerpo 2B6 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo 2B6 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo 2B6 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

En una realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB también puede disminuir la afinidad de la región Fc por FcγRIIB en relación con el anticuerpo de tipo natural. En aún otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico, y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. En una realización relacionada, la región Fc variante comprende además una o más modificaciones de aminoácidos dadas a conocer en las tablas 4, 5, 9, y 10, a continuación.

También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b (por ejemplo, quimérico, humanizado) que comprende una región Fc variante y el uso de los anticuerpos para el tratamiento de cáncer. En realizaciones específicas, el anticuerpo que se une a CD79b o CD79b tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina. También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b receptor que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo que se une a CD79a o CD79b que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

También se describe un anticuerpo que se une a ErbB1 (por ejemplo, quimérico, humanizado) que comprende una región Fc variante y el uso de los anticuerpos para el tratamiento de cáncer. En realizaciones específicas, el anticuerpo que se une a ErbB1 tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina. También se

describe un anticuerpo que se une a ErbB1 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo que se une a receptor de ErbB1 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo que se une a ErbB1 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo que se une a ErbB1 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo que se une a ErbB1 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ (por ejemplo, quimérico, humanizado) que comprende una región Fc variante y el uso de los anticuerpos para el tratamiento de cáncer. En realizaciones específicas, el anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina. También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD103, CTLA4, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β , o receptor de TNF- γ que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

También se describen polinucleótidos que codifican para una molécula de la invención, incluyendo polipéptidos y anticuerpos, identificados por los métodos descritos. Pueden obtenerse los polinucleótidos que codifican para las moléculas, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica. También se describe un ácido nucleico aislado que codifica para una molécula tal como se describe en el presente documento. También se describe un vector que comprende dicho ácido nucleico. También se describen células huésped que contienen los vectores o polinucleótidos.

También se describen métodos para la producción de las moléculas. Las moléculas, incluyendo polipéptidos y anticuerpos, pueden producirse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, en particular, mediante expresión recombinante. También se describe un método para producir de manera recombinante una molécula tal como se describe en el presente documento, comprendiendo dicho método: (i) cultivar en un medio una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica para dicha molécula, en condiciones adecuadas para la expresión de dicha molécula; y (ii) recuperación de dicha molécula a partir de dicho medio.

Las moléculas identificadas según los métodos son útiles en la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en donde se desea una eficacia potenciada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por Fc γ R, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, y en el potenciamiento de la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC.

También se describe un método de tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une al antígeno de cáncer, que se ha modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento. También se describe un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer, comprendiendo dicho anticuerpo terapéutico una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a Fc γ RIIIA por medio de su región Fc con una afinidad mayor que la del anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo natural que se une a Fc γ RIIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones 329, 331 ó 332, y no tenga una alanina en cualquiera de las

posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360 ó 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334. También se describe un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho anticuerpo terapéutico una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural de modo que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a Fc γ RIIIA por medio de su región Fc con una afinidad mayor que la de un anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo natural que se une a Fc γ RIIIA, y dicho anticuerpo terapéutico se une además específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad menor que la de un anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo natural que se une a Fc γ RIIB, siempre que dicha región Fc variante no tenga una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333 ó 334. También se describe un método para tratar cáncer en un paciente caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer y dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante de modo que el anticuerpo tiene una actividad de ADCC potenciada.

También se describe un método de tratamiento de un trastorno autoinmunitario y/o trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicha molécula se une específicamente a Fc γ RIIB por medio de su región Fc con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural, y dicha molécula se une además específicamente a Fc γ RIIIA por medio de su región Fc con una afinidad menor que la de una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural, y dicha molécula se une a un complejo inmunitario (por ejemplo, un complejo de antígeno/anticuerpo). También se describe un método de tratamiento de un trastorno autoinmunitario y/o trastorno inflamatorio que comprende además administrar uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, usados para el tratamiento y/o la prevención de tales enfermedades.

También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento que se unen a un agente infeccioso o receptor celular del mismo. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante las moléculas están provocadas agentes infecciosos incluyendo pero sin limitarse a virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Las moléculas que comprenden regiones Fc variantes pueden tener una función efectora de anticuerpo potenciada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En una realización específica, las moléculas descritas en el presente documento potencian la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa potenciando la fagocitosis y/u opsonización del agente infeccioso que provoca la enfermedad infecciosa. En otra realización específica, las moléculas descritas en el presente documento potencian la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa potenciando ADCC de células infectadas que provocan la enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas descritas en el presente documento en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula descrita en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido que comprende una región Fc variante, una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante, un anticuerpo terapéutico modificado por ingeniería genética tal como se describe en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo pero sin limitarse a agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores.

4.1 DEFINICIONES

Tal como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define para extenderse desde Cys226 hasta el extremo carboxilo. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también denominada dominio "C γ 2") se extiende habitualmente desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 338. El dominio CH3 de una

región Fc de IgG humana se extiende habitualmente desde los aminoácidos 342 hasta 447. El dominio CH2 es único en que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas a N entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

- 5 En toda la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice de la UE como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El “índice de la UE como en Kabat” se refiere a la numeración del anticuerpo de IgG1 humana de la UE.
- 10 La “región de bisagra” se define generalmente como extensión desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana. Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando los residuos de cisteína primero y último que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos antidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los
- 20 anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “región Fc variante” se pretende que denote una región Fc que se ha modificado, mediante sustitución, inserción o delección de uno o más residuos de aminoácido en relación con la región Fc de la molécula sin modificar (es decir, la inmunoglobulina “de tipo natural”). La presente invención se refiere a moléculas que presentan regiones Fc que tienen una razón de afinidades alterada para un FcγR que activa una función efectora celular (es decir, “un FcγR_{Activante},” tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) en relación con un FcγR
- 30 que inhibe una función efectora celular (es decir, “un FcγR_{Inhibidor},” tal como FcγRIIB):

$$\text{Razón de afinidades} = \frac{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{activante}}}{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{inhibidor}}}$$

- 35 Por tanto, para cualquier molécula particular que tiene una región Fc variante, la razón de afinidades de la molécula se determina calculando la diferencia de afinidad de la región Fc variante de la molécula con un FcγR_{Activante} (por ejemplo, con FcγRIIA o con FcγRIIIA), en relación con la afinidad de una inmunoglobulina de tipo natural con tal FcγR_{Activante} (por ejemplo, Afinidad_{FcγRIIA} de la región Fc variante - Afinidad_{FcγRIIA} de la inmunoglobulina de tipo natural), y dividiendo tal diferencia entre la diferencia de afinidad con un FcγR_{Inhibidor} (por ejemplo, FcγRIIB) de la región Fc variante de la molécula, en relación con la afinidad de una inmunoglobulina de tipo natural con tal
- 40 FcγR_{Inhibidor} (por ejemplo, Afinidad_{FcγRIIB} de la región Fc variante - Afinidad_{FcγRIIB} de la inmunoglobulina de tipo natural). Una razón de afinidades aumentada puede resultar de la región Fc de la molécula que tiene (en relación con una Fc de tipo natural) un aumento de la afinidad por un FcγR_{Activante} (por ejemplo, con FcγRIIA o con FcγRIIIA) junto con o bien una afinidad sin cambios por un FcγR_{Inhibidor} (por ejemplo, FcγRIIB) o bien una disminución de la afinidad por tal FcγR_{Inhibidor}. Alternativamente, una razón de afinidades aumentada puede resultar de la región Fc de tal molécula que
- 45 presenta un aumento de la afinidad por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que el aumento de la afinidad por el FcγR_{Activante} supere el aumento de la afinidad por el FcγR_{Inhibidor} (es decir, la unión al FcγR_{Activante} aumenta “enormemente” en comparación con la unión al FcγR_{Inhibidor}, que apenas aumenta), o puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una afinidad disminuida por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que la disminución de la afinidad
- 50 por el FcγR_{Activante} sea menor que la disminución de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor} (es decir, la unión al FcγR_{Inhibidor} disminuye “enormemente” en comparación con la unión al FcγR_{Activante}, que apenas disminuye), o puede resultar de una afinidad sin cambios por un FcγR_{Activante} junto con una disminución de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor}. Una razón de afinidades disminuida puede resultar de la región Fc de la molécula que tiene (en relación con una Fc de tipo natural) una disminución de la afinidad por un FcγR_{Activante} junto con o bien una afinidad sin cambios por un
- 55 FcγR_{Inhibidor} o bien un aumento de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor}. Alternativamente, una razón de afinidades disminuida puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una disminución de la afinidad por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con una Fc de tipo natural), siempre que la disminución de la afinidad por el FcγR_{Activante} supere la disminución de la afinidad por el FcγR_{Inhibidor} (es decir, la unión al FcγR_{Activante} disminuye “enormemente” en comparación con la unión al FcγR_{Inhibidor}, que apenas disminuye), o puede resultar de la región Fc de tal molécula que presenta una afinidad aumentada por tanto un FcγR_{Activante} como un FcγR_{Inhibidor} (en relación con
- 60

una Fc de tipo natural), siempre que el aumento de la afinidad por el FcγR_{Activante} sea menor que el aumento de la afinidad por el un FcγR_{Inhibidor} (es decir, la unión al FcγR_{Inhibidor} aumenta “enormemente” en comparación con la unión al FcγR_{Activante}, que apenas aumenta), o puede resultar de una afinidad sin cambios por un FcγR_{Activante} junto con un aumento de la afinidad por un FcγR_{Inhibidor}.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuo de aminoácido. El término “derivado” tal como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o proteína que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede producirse una proteína o polipéptido derivado mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado o derivado de proteína presenta una función similar o idéntica que la del polipéptido o proteína del que se derivó.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de un derivado no proteináceo se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero no se limita a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o deleción de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera intercambiable para referirse a un estado en un sujeto. En particular, el término “enfermedad autoinmunitaria” se usa de manera intercambiable con el término “trastorno autoinmunitario” para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, tisular y/o de los órganos provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se usa de manera intercambiable con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con inflamación. Además, la inflamación puede o no estar provocada por un trastorno autoinmunitario. Por tanto, determinados trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a un neoplasma o tumor que resulta del crecimiento descontrolado anómalo de células. Tal como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales vecinas y se ha diseminado a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con un antígeno de cáncer específico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “agente inmunomodulador” y variaciones del mismo se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En determinadas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En determinadas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, pequeñas moléculas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que logra una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une un anticuerpo de manera inmuno-específica tal como se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. No necesariamente los epítipos antigénicos han de ser inmunogénicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de ADN y moléculas de ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótido, que incluyen, pero no se limitan a, bases de inosina o triadas. Tales análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras principales modificadas que prestan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener tanto porciones monocatenarias como bicatenarias, y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar el inicio de una enfermedad, por ejemplo, retrasar o minimizar la diseminación de un cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico descrito en el presente documento significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención de un trastorno, o prevención de la reaparición o diseminación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la reaparición o diseminación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de tal en un paciente, incluyendo pero sin limitarse a aquellos predispuestos a enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo aquellos predispuestos genéticamente al cáncer o expuestos previamente a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico descrito en el presente documento significa que la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la prevención de la reaparición o inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “en combinación” se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término “en combinación” no limita el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), de manera concomitante con, o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas tras) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

“Función efectora” tal como se usa en el presente documento significa un acontecimiento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o ligando. Las funciones efectoras incluyen pero no se limitan a citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto aquellas que actúan tras la unión de un antígeno y aquellas que actúan independientemente de la unión a antígeno.

“Célula efectora” tal como se usa en el presente documento significa una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero no se limitan a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células citolíticas naturales (NK), y pueden ser a partir de cualquier organismo incluyendo pero sin limitarse a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

“Ligando de Fc” tal como se usa en el presente documento significa una molécula, preferiblemente un polipéptido, a partir de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a FcγR, FcγR, FcγR, FcRn, C1q, C3, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcγR viral. Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

5. Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 ÁRBOL DE DECISIÓN PARA LA SELECCIÓN DE MUTANTES DE Fc

5 Un protocolo a modo de ejemplo para seleccionar mutantes de Fc.

Fig. 2 ESQUEMA DE LA SECUENCIA DEL DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA 8B5.3.4

Representación del nucleótido VH 8B5.3.4 y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12 y 9, respectivamente).

10

Fig. 3 ESQUEMA DE LA SECUENCIA DEL DOMINIO VARIABLE DE CADENA LIGERA 8B5.3.4

Representación del nucleótido VL 8B5.3.4 y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11 y 10, respectivamente).

15

Fig. 4 CAPTURA DE ANTICUERPO CH 4-4-20 SOBRE LA SUPERFICIE DE BSA-FITC

Se inyectaron 6 μ l de anticuerpo a una concentración de aproximadamente 20 μ g/ml a 5 μ l/min sobre una superficie de BSA-isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se muestra el sensograma BIAcore de la unión de anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes sobre la superficie del chip de sensor inmovilizado en BSA-FITC. El marcador se estableció en respuesta de anticuerpo capturado de tipo natural.

20

Fig. 5 SENSOGRAMA DE LA UNIÓN EN TIEMPO REAL DE Fc γ RIIIA A ANTICUERPOS CH 4-4-20 QUE PORTAN REGIONES FC VARIANTES

25 Se analizó la unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes a 200 nM de concentración. Se normalizaron las respuestas al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo natural.

Los mutantes usados fueron tal como sigue: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14 (K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

30

Figs. 6 A-H ANÁLISIS DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UNIÓN DE Fc γ RIIIA A ANTICUERPOS QUE PORTAN REGIONES FC VARIANTES

Se obtuvieron parámetros cinéticos para la unión de Fc γ RIIIA a anticuerpos que portan regiones Fc variantes generando curvas de mejor ajuste diferentes para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo basándose en los valores k_{dis} calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 s. Los valores K_d y k_{dis} representan el promedio de dos concentraciones.

35

Fig. 7 SENSOGRAMA DE LA UNIÓN EN TIEMPO REAL DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN Fc γ RIIB-Fc A ANTICUERPOS QUE PORTAN REGIONES FC VARIANTES

40

Se analizó la unión de proteínas de fusión Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes a 200 nM de concentración. Se normalizaron las respuestas al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo natural.

45

Figs. 8 A-C ANÁLISIS DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UNIÓN PROTEÍNAS DE FUSIÓN Fc γ RIIB-Fc A ANTICUERPOS QUE PORTAN REGIONES Fc VARIANTES

Se obtuvieron parámetros cinéticos para la unión de Fc γ RIIB-Fc a anticuerpos que portan regiones Fc variantes generando curvas de mejor ajuste diferentes para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo basándose en los valores k_{dis} calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 s. Los valores K_d y k_{dis} representan el promedio de dos concentraciones.

50

Los mutantes usados fueron tal como sigue: Mut 6 (S219V), Mut 10 (P396L, A330S, K288N); Mut 18 (K326E); Mut 14 (K334E, K288N); Mut 11 (R255L, F243L); Mut 16 (F372Y); Mut 19 (K334N, K246I).

55

Fig. 9 RAZONES DE K_{dis} (WT, *de tipo natural*)/ K_{dis} (mutante) PARA Fc γ RIIIA-Fc TRAZADAS FRENTE A DATOS DE ADCC

Números mayores que uno muestran una tasa de disociación disminuida para la unión de Fc γ RIIIA y una tasa de disociación aumentada para la unión de Fc γ RIIB-Fc en relación con el tipo natural. Los mutantes en la caja tienen una tasa de disociación menor para la unión de Fc γ RIIIA y una tasa de disociación mayor para la unión de Fc γ RIIB-Fc.

60

Fig. 10 COMPETICIÓN CON Fc γ RIIIA NO MARCADO

65

Se implementó un examen cinético para identificar mutantes de la región Fc con tasas K_{dis} mejoradas para la unión de Fc γ RIIIA. Se incubó una biblioteca de variantes de la región Fc que contenían la mutación P396L con Fc γ RIIIA-ligador-Avitag biotilado 0,1 μ M durante una hora y luego se lavó. Posteriormente se incubaron 0,8 μ M de Fc γ RIIIA sin marcar con la levadura marcada durante diferentes puntos de tiempo. Se centrifugó la levadura y se retiró Fc γ RIIIA sin marcar. Se tiñó la levadura unida a receptor con SA (estreptavidina):PE (ficoeritrina) para análisis FACS.

Figs. 11 A-C ANÁLISIS FACS BASADO EN LA PANTALLA CINÉTICA

Basándose en la K_{dis} calculada a partir de los datos presentados en la figura 22, se escogió una selección de punto de tiempo de un minuto. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca con monómero Fc γ RIIIA-ligador-Avitag biotilado 0,1 μ M; se lavaron las células y se incubaron con ligando sin marcar durante un minuto; luego se lavaron y se marcaron con SA:PE. Entonces se clasificaron las células mediante FACS, seleccionando los ligadores del 0,3% superior. Se comparó la biblioteca P396L no seleccionada con las células de levadura seleccionadas para unión mejorada mediante FACS. Los histogramas muestran el porcentaje de células que están teñidas conjuntamente con tanto Fc γ RIIIA /PE como Fc/FITC anti-humano de cabra.

Figs. 12 A-B SELECCIÓN BASÁNDOSE EN EL AGOTAMIENTO DE LA FASE SÓLIDA DE LOS LIGADORES DE Fc γ RIIB Fc

A. Se examinó la biblioteca P396L basándose en el agotamiento de Fc γ RIIB y selección de Fc γ RIIIA usando perlas magnéticas. Se repitió el agotamiento de Fc γ RIIB mediante perlas magnéticas 5 veces. Se analizó la población de levadura resultante y se encontró que mostraba más del 50% de tinción celular con Fc anti-humano de cabra y un porcentaje muy pequeño de células teñidas con Fc γ RIIIA. Posteriormente se seleccionaron células dos veces mediante FACS usando Fc γ RIIIA-ligador-avitag biotilado 0,1 μ M. Se analizaron células de levadura para tanto la unión de Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB tras cada clasificación y se compararon con la unión del tipo natural.

B. Se seleccionaron mutantes de Fc de la población de levadura con Fc γ RIIB agotado usando monómero Fc γ RIIIA 158F ligador avitag biotilado como ligando. La compuerta de clasificación se estableció para seleccionar los ligadores Fc γ RIIIA 158F del 0,25% superior. Se analizó la población enriquecida resultante mediante FACS para la unión a diferentes Fc γ RIIIA (158F y 158V), Fc γ RIIB y Fc γ RIIA (131R).

Fig. 13 TASAS RELATIVAS DE LISIS DE CÉLULAS DIANA SKBR3 MEDIADA POR MUTANTES DE FC QUE ALBERGAN 4D5 QUIMÉRICO

Se calcularon las tasas de lisis relativas para cada mutante de Fc sometido a prueba. Se dividieron las tasas de lisis para el anticuerpo 4D5 con mutantes de Fc entre la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 4D5 de tipo natural. Se promediaron los datos de al menos 2 ensayos independientes y se representaron en el histograma. Para cada mutante de Fc, se muestran los datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes. Se escogieron las concentraciones de anticuerpo para flanquear el punto a lo largo de la curva en el que la lisis fue de ~50%.

Fig. 14 TASAS RELATIVAS DE LISIS DE CÉLULAS DAUDI MEDIADA POR MUTANTES DE FC QUE ALBERGAN 2H7 QUIMÉRICO

Se calcularon las tasas de lisis relativas para cada mutante de Fc sometido a prueba. Se dividieron las tasas de lisis para el anticuerpo 2H7 con mutantes de Fc entre la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 2H7 de tipo natural. Se promediaron los datos de al menos 1-2 ensayos independientes y se representaron en el histograma. Para cada mutante de Fc, se muestran los datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes. Se escogieron las concentraciones de anticuerpo basándose en el punto a lo largo de la curva en el que la lisis fue de ~50%.

Fig. 15 Paneles A-E PERFILES DE RECEPTOR DE Fc MEDIANTE FACS TRAS TRATAMIENTO DE MONOCITOS CON CITOCINA.

El tratamiento de monocitos con citocina aumenta la expresión del receptor de Fc de baja afinidad. Se cultivaron monocitos sometidos a elutriación usando citocinas específicas en medios libres de suero. Se sometieron a ensayo perfiles de receptor de Fc usando FACS.

Fig. 16 DESTRUCCIÓN MEJORADA DE CÉLULAS TUMORALES USANDO MUTANTES DE FC EN ADCC BASADOS EN MONOCITOS DERIVADOS DE MACRÓFAGOS.

Se sometió a prueba concentración de AcM Ch4D5 a lo largo de 2 logs usando una razón de efector:diana de 35:1. Se calculó el porcentaje de lisis como en la figura 30.

Fig. 17 DIAGRAMA DE FLUJO DE CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL COMPLEMENTO.

El diagrama de flujo resume los ensayos de CDC usados.

Fig. 18 ACTIVIDAD DE CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL COMPLEMENTO

5 Los mutantes de Fc que muestran unión potenciada a FcγRIIIA también mostraron actividad de complemento mejorada. Se valoró AcM Ch anti-CD20 a lo largo de 3 órdenes de magnitud. Se calculó el porcentaje de lisis como en la figura 30.

10 Fig. 19 UNIÓN DE C1q A ANTICUERPO 2B6

A. El diagrama representa el formato BIAcore para el análisis de la unión de 2B6 al primer componente de la cascada del complemento.

15 B. Sensograma de la unión en tiempo real del anticuerpo 2B6 que porta regiones Fc variantes a C1q.

Figs. 20 A-D UNIÓN DE C1q A ANTICUERPO MUTANTE 2B6.

20 Sensograma de la unión en tiempo real de mutantes de 2B6 a C1q (3,25 nM). Mutantes representados en MgFc51 (Q419H, P396L); MgFc51/60 en el panel A; MgFc55 y MgFc55/60 (panel B), MgFc59 y MgFc59/60 (panel C); y MgFc31/60 (panel D).

Figs. 21 A-D VARIANTES DE Fc CON UNIÓN DISMINUIDA A FcγRIIB

25 Se analizó la unión de FcR a anticuerpos ch4D5 para comparar el efecto de D270E (60) en R255L, mutante doble P396L (MgFc55). K_D a diferentes concentraciones de FcR; CD16A 158V 400 nM; CD16A 158F 800 nM; CD32B 200 nM; 200 nM CD32A 131H. Se realizó el análisis usando K_D diferentes usando el software Biacore 3000.

30 Figs. 22 A-D CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE MUTANTES DE 4D5 SELECCIONADOS DE AGOTAMIENTOS DE FcγRIIB/SELECCIÓN DE FcγRIIAH131

35 Se analizó la unión de FcR a anticuerpos ch4D5 que portan diferentes mutaciones de Fc seleccionadas mediante estrategia agotamiento de CD32B y examen de CD32A H131. K_D a diferentes concentraciones de FcR; CD16A 158V 400 nM; CD16A 158F 800 nM; CD32B 200 nM; CD32A 131H 200 nM. Se realizó el análisis usando K_D diferentes usando el software Biacore 3000.

Fig. 23. GRÁFICO DE DATOS DE MDM ADCC FRENTE A LA K_{DIS} DETERMINADA PARA LA UNIÓN DE CD32A 131H TAL COMO SE DETERMINA MEDIANTE BIACORE.

40 Los mutantes son los siguientes: MgFc 25 (E333A, K334A, S298A); MgFc68 (D270E); MgFc38 (K392T, P396L); MgFc55 (R255L, P396L); MgFc31 (P247L, N421K); MgFc59 (K370E, P396L).

45 Figs. 24 A-B. ACTIVIDAD DE ADCC DE MUTANTES EN UN ANTICUERPO QUIMÉRICO MONOCLONAL HER2/NEU

Se evaluaron anticuerpos monoclonales HER2/neu quiméricos que contenían regiones Fc mutantes, por duplicado, para determinar su actividad de ADCC y se compararon con la actividad de ADCC del anticuerpo Her2/neu quimérico de tipo natural. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc88 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L), MGFc88A (F243L, R292P, Y300L, P396L), MGFc155 (F243L, R292P, Y300L).

50 Figs. 25 A-B. PESO DE TUMOR ESTIMADO EN RATONES TRATADOS h2B6 MUTANTE DE Fc O DE TIPO NATURAL

55 Se inocularon ratones desnudos Balb/c por vía subcutánea con células Daudi y se les administraron dosis semanales de 25 µg, 2,5 µg o 0,25 µg de o bien h2B6 de tipo natural (A) o bien h2B6 que alberga el mutante de Fc MGFc 0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (B). Los ratones a los que se les administró tampón solo se usaron como control. Se calculó el peso de tumor basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula ($\text{ancho}^2 \times \text{longitud}$)/2.

60 Figs. 26 A-B. SUPERVIVENCIA EN RATONES QUE PORTAN TUMORES TRATAMOS CON h2B6 MUTANTE DE Fc O DE TIPO NATURAL

65 Se inocularon ratones desnudos con células Daudi y se les administraron dosis semanales de 25 µg, 2,5 µg o 0,25 µg de o bien h2B6 de tipo natural (A) o bien h2B6 que alberga el mutante de Fc MGFc 0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (B). Los ratones a los que se les administró tampón solo se usaron como control.

Fig. 27. PESO DE TUMOR ESTIMADO RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO TRATADOS CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 5 Se inocularon ratones mCD16^{-/-} huCD16A⁺ RAG1^{-/-} C57Bl/6 por vía subcutánea con células Raji y tras dos semanas, se les administraron por vía intraperitoneal seis dosis semanales de o bien tampón solo (PBS), o 250 µg, 25 µg o 2,5 µg de h2B6 de tipo natural (Rituxan) o h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (MGA321). Se calculó el peso de tumor basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula (ancho² x longitud)/2. Las líneas se corresponden con el peso de tumor, a lo largo del tiempo, para cada ratón individual sometido a prueba.

Figs. 28 A-B. PESO DE TUMOR ESTIMADO RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO TRATADOS CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 15 Se inocularon ratones mCD16^{-/-} huCD16A⁺ RAG1^{-/-} C57Bl/6 por vía subcutánea con células Raji y tras tres semanas, se les administraron por vía intraperitoneal cinco dosis semanales de 250 µg, 25 µg o 2,5 µg de h2B6 de tipo natural (Rituxan "Rituximab") (A) o h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (h2B6 0088 "MGA321") (B). Se calculó el peso de tumor basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula (ancho² x longitud)/2.

Fig. 29. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON h2B6 31/60 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 25 Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (FoxN1) con células EL4-CD32B y se les administró por vía intraperitoneal en los días 0, 1, 2, 3 y 6 o bien h2B6 1.3 de tipo natural h2B6 1.3 que comprende el mutante 31/60 (P247L, D270E, N421K) (h2B6 1.3 3160). Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control.

Fig. 30. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON h2B6 31/60 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 30 Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (FoxN1) con células EL4-CD32B y se les administró por vía intraperitoneal en los días 0-3 y 6 dosis de 10 µg/g de peso corporal de o bien h2B6 que comprende el mutante 31/60 (P247L, D270E, N421K) (h2B6 3160) o bien h2B6 de tipo natural.

Figs. 31 A-B. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 40 (A) Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (FoxN1 o N/N) con células EL4-CD32B y se les administró por vía intraperitoneal en los días 0-3 dosis de o bien h2B6 3.5 N297Q (control negativo), h2B6 3.5 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (h2B6 3.5 0088) o h2B6 3.5 de tipo natural. Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control. (B) A los ratones que portaban tumores como en A se les administraron por vía intraperitoneal en los días 0-3 y 6 dosis de 4 µg/g de peso corporal de o bien PBS, h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (h2B6 0088) o bien h2B6 de tipo natural.

Fig. 32. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 50 Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ hCD32A⁺ (FoxN1 o N/N) con células EL4-CD32B y se les administró por vía intraperitoneal en los días 0-3 o bien h2B6 3.5 N297Q (control negativo), h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (h2B6 3.5 0088) o bien h2B6 3.5 de tipo natural. Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control.

Figs. 33 A-C. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

- 60 Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos (FoxN1) con células EL4-CD32B y se les administró por vía intraperitoneal en los días 0-3 o bien h2B6 3.5 N297Q (control negativo), h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) (h2B6 3.5 88) o bien h2B6 3.5 de tipo natural. Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control. Las cepas de ratones transgénicos examinadas fueron (A) mCD16^{-/-} huCD16A⁺, (B) mCD16^{-/-} huCD16A⁺ hCD32A⁺ y (C) mCD16^{-/-} hCD32A⁺.

Fig. 34. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS A INTERVALOS VARIABLES CON h2B6 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO

NATURAL

Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (FoxN1 o N/N) con células EL4-CD32B y se trataron por vía intraperitoneal con h2B6 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (MGA321) en los intervalos de tiempo indicados.

Figs. 35 A-B. PESO DE TUMOR ESTIMADO EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO TRATADOS CON ch4D5 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

Se inocularon por vía subcutánea ratones desnudos (FoxN1) con el genotipo transgénico mCD16^{-/-} hCD16A⁺ (A) o mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD32A⁺ (B) con células mSCOV3 y, empezando en el día 0, se les administraron por vía intraperitoneal ocho dosis semanales de o bien ch4D5 N297Q (control negativo) o bien ch4D5 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (ch4D5 0088). Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control. Se calculó el peso de tumor basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula (ancho² x longitud)/2.

Figs. 36 A-B. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON ch4D5 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (N/N) con células mSKOV3 y, empezando en el día 0, se les administraron por vía intraperitoneal seis dosis semanales de o bien 100 µg (A) o bien 1 µg (B) de o bien ch4D5 de tipo natural, ch4D5 N297Q (control negativo) o bien ch4D5 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (ch4D5 0088). Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control.

Figs. 37 A-B. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON VARIANTES DE ch4D5 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos mCD16^{-/-} huCD16A⁺ (N/N) con células mSKOV3 y, empezando en el día 0, se les administraron por vía intraperitoneal ocho dosis semanales de o bien 100 µg (A) o bien 10 µg (B) de o bien ch4D5 de tipo natural, ch4D5 N297Q (control negativo), ch4D5 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (ch4D5 0088), mutante de ch4D5 MGFc0155 (F243L, R292P, Y300L) (ch4D5 0155) o bien mutante de ch4D5 MCFc3160 (P247L, D270E, N421K) ("ch4D5 3160"). Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control.

Figs. 38 A-B. SUPERVIVENCIA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN RECEPTOR DE Fc HUMANO QUE PORTAN TUMORES TRATADOS CON ch4D5 0088 CON Fc OPTIMIZADA O DE TIPO NATURAL

Se inocularon por vía intraperitoneal ratones desnudos (N/N) con el genotipo transgénico mCD16^{-/-} hCD16A⁺ (A) o mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD32A⁺ (B) con células mSKOV3 y, empezando en el día 0, se les administraron por vía intraperitoneal ocho dosis semanales de o bien ch4D5 que comprende el mutante FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) (ch4D5 0088) o bien ch4D5 N297Q (control negativo). Los ratones a los que se les administró tampón solo (PBS) se usaron como control.

Fig. 39 A-D. LA OPTIMIZACIÓN DE Fc POTENCIA EL AGOTAMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES *IN VIVO*.

(A-B) Reducción potenciada de carga tumoral mediante tratamiento con hu2B6 con Fc modificada por ingeniería genética de xenoinjertos subcutáneos de células Daudi en ratones Balb/c FoxN1 (nu/nu) (6-8 ratones/grupo). Se determinó la significación estadística entre curvas mediante una prueba de la T de Student; WT frente a MG12, P=0,431; WT frente a MG4, P = 0,002; MG4 frente a MG12, P = 0,002. (C-D) Gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones FoxN1 mFcγRIII^{-/-} CD16A humana + a los que se les inyectó por vía intraperitoneal células CD32B-EL4 (10 ratones/grupo) y se trataron con o bien WT-Fc hu2B6 o bien las formas de hu2B6 con Fc modificada por ingeniería genética indicadas (C, 10 µg/g; D, 4 µg/g). Se analizaron los datos para determinar la significación usando análisis de log-rango.

Fig. 40. PATRONES DE GLICOSILACIÓN DE ANTICUERPOS QUE TIENEN REGIONES FC ALTERADAS.

(Paneles A-D) muestran los resultados de investigaciones en los patrones de glicosilación de los anticuerpos (la señal detectada se representa gráficamente en lúmenes frente a tiempo de elución cromatográfico en minutos). En todos los paneles, ■ es GlcNAc; ● es galactosa; ○ es manosa y Δ es fucosa. El panel A muestra la asignación de oligosacáridos unidos a N as determinada usando un panel de referencia de anticuerpos. Los paneles B y C muestran los resultados en dos preparaciones de anticuerpo ch45D4-FcMT2. El panel D es un control de digesto. Las flechas indican las asignaciones de patrones de glicosilación con picos; las flechas discontinuas indican las posiciones esperadas de los patrones de glicosilación del panel A.

Fig. 41. ESTRUCTURA DE GLICOSILACIÓN DE GlcNAc₂Man₉ ("Man9").

La estructura de glicosilación de GlcNAc₂Man₉ ("Man9"). La escisión de unidades de manosa da como resultado la formación de las estructuras GlcNAc₂Man₈ ("Man8"), GlcNAc₂Man₇ ("Man7"), GlcNAc₂Man₆ ("Man6") y GlcNAc₂Man₅ ("Man5").

Fig. 42. ESTRUCTURA DE GLICOSILACIÓN DE GlcNAc₂Man₅ ("Man5").

La estructura GlcNAc₂Man₅ ("Man5") se procesa mediante la acción sucesiva de glicosiltransferasas para generar los oligosacáridos "G0F," "G1F" y "G2F".

Fig. 43. ESTRUCTURA DE GLICOSILACIÓN Y UNIÓN A FcγR DE TETRAVARIANTE DE Fc: F243X, R292P, Y300L, P396L

La figura muestra el efecto de alterar la identidad del residuo sustituido en la posición F243 de una tetravariante (F243X, R292P, Y300L, P396L) en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

Fig. 44. ESTRUCTURA DE GLICOSILACIÓN Y UNIÓN A FcγR DE TETRAVARIANTE DE Fc: F243L, R292X, Y300L, P396L

La figura muestra el efecto de alterar la identidad del residuo sustituido en la posición R292 de una tetravariante (F243L, R292X, Y300L, P396L) en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

Fig. 45. EFECTO DE ALTERACIONES PROGRESIVAS DE LOS RESIDUOS R292, Y300 Y P396 DE UNA VARIANTE DE Fc F243C

La figura muestra el efecto de alterar progresivamente la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243C en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

Fig. 46. EFECTO DE ALTERACIONES PROGRESIVAS DE LOS RESIDUOS R292, Y300 Y P396 DE UNA VARIANTE DE Fc F243C

La figura muestra el efecto de alterar progresivamente la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243L en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

Fig. 47. EFECTO DE ALTERACIONES PROGRESIVAS DE LOS RESIDUOS R292, Y300 Y P396 DE UNA VARIANTE DE Fc F243R

La figura muestra el efecto de alterar progresivamente la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243R en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

Fig. 48. EFECTO DE ALTERACIONES PROGRESIVAS DE LOS RESIDUOS R292, Y300 Y P396 DE UNA VARIANTE DE Fc F243V

La figura muestra el efecto de alterar progresivamente la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243V en el perfil de glicosilación observado de la variante y en la unión relativa ($K_{\text{disociación}}$ de tipo natural / $K_{\text{disociación}}$ de variante) de la variante de Fc a los receptores de Fc, CD16A, CD32A y CD32B.

6. Descripción detallada

Se describen métodos de tratamiento de cáncer u otras enfermedades usando moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyendo inserciones o deleciones) en una o más regiones, modificaciones que alteran, por ejemplo, aumentan o disminuyen, la afinidad de la región Fc variante por un FcγR. Potenciar la capacidad de las inmunoglobulinas para mediar citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) proporciona un enfoque para

potenciar la actividad terapéutica de inmunoglobulinas contra cánceres y enfermedades infecciosas.

También se describen anticuerpos terapéuticos en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno, o la mejora de un síntoma del mismo, en donde se desea una eficacia potenciada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa, o en donde se desea una modulación de la función celular efectora mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. También se describe el uso de moléculas que comprenden regiones Fc con modificaciones de aminoácidos incluyendo pero sin limitarse a cualquiera de las modificaciones dadas a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514; y publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351.

Los polipéptidos pueden tener dominios Fc variantes. La modificación del dominio Fc conduce normalmente a un fenotipo alterado, por ejemplo semivida sérica alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada. Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, para potenciar la efectividad del anticuerpo en el tratamiento de cáncer, por ejemplo. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos, por ejemplo en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica bloqueo o antagonismo, pero sin destruir las células que portan un antígeno diana. Generalmente es deseable una función efectora aumentada cuando se dirige a células no deseables, tales como células tumorales y foráneas, en donde los FcγR se expresan a bajos niveles, por ejemplo, células B específicas de tumor con bajos niveles de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, CLL y linfoma de Burkitt). En dichas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento con actividad de la función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, trastorno o infección en donde se desea una eficacia potenciada de actividad de la función efectora.

En determinadas realizaciones, las moléculas comprenden una o más modificaciones a los aminoácidos del dominio Fc, que reducen la afinidad y avidéz de la región Fc y, por tanto, la molécula descrita en el presente documento, para uno o más receptores de FcγR. En otras realizaciones, las moléculas comprenden una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc, que aumentan la afinidad y avidéz de la región Fc y, por tanto, la molécula descrita en el presente documento, para uno o más receptores de FcγR. En otras realizaciones, las moléculas comprenden un dominio Fc variante en el que dicha variante confiere o media actividad de ADCC aumentada y/o una unión aumentada a FcγRIIA, en relación con una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo natural. En realizaciones alternativas, las moléculas comprenden un dominio Fc variante en el que dicha variante confiere o media actividad de ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión aumentada a FcγRIIB, en relación con una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo natural.

También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, región Fc variante que no muestra una unión detectable a ningún FcγR, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, región Fc variante que sólo se une a un FcγR individual, preferiblemente uno de FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIA.

Los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden afinidades alteradas por un receptor de Fcγ activante y/o inhibidor. En una realización, el anticuerpo o polipéptido comprende una región Fc variante que tiene afinidad aumentada por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. En otra realización, los polipéptidos comprenden una región Fc variante, que tiene afinidad disminuida para FcγRIIB y afinidad aumentada para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. En aún otra realización, los polipéptidos comprenden una región Fc variante que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural. En todavía otra realización, los polipéptidos comprenden una región Fc variante, que tiene afinidad inalterada por FcγRIIB y afinidad disminuida (o aumentada) por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo natural.

También se describen inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA de modo que la inmunoglobulina tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Los ejemplos no limitativos de funciones efectoras celulares incluyen citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q, y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En una realización preferida, la alteración en la afinidad o función efectora es de al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En otras realizaciones de la invención, la región Fc variante de manera inmunoespecífica se une a uno o más FcR con al menos el 65%, preferiblemente al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 100%, el 125%, el 150%, el 175%, el 200%, el 225% o el 250% de afinidad mayor en

relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural. Tales mediciones pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro*, y en una realización preferida son ensayos *in vitro* tales como ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial.

- 5 En diferentes realizaciones, las moléculas comprenden un dominio Fc variante en el que dicha variante agoniza al menos una actividad de un receptor FcγR, o antagoniza al menos una actividad de un receptor FcγR. En una realización preferida, las moléculas comprenden una variante que agoniza (o antagoniza) una o más actividades de FcγRIIB, por ejemplo, señalización mediada por receptor de células B, activación de células B, proliferación de células B, anticuerpo producción, aflujo de calcio intracelular de células B, progresión del ciclo celular, inhibición
10 mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI, fosforilación de FcγRIIB, reclutamiento de SHIP, fosforilación y asociación de SHIP con Shc, o actividad de una o más moléculas aguas abajo (por ejemplo, MAP cinasa, JNK, p38 o Akt) en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización, las moléculas comprenden una variante que agoniza (o antagoniza) una o más actividades de FcεRI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción de citocinas o liberación de serotonina.

- 15 En determinadas realizaciones, las moléculas comprenden un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Los diversos isotipos de IgG presentan propiedades físicas y funcionales que difieren incluyendo semivida sérica, fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividad de las funciones efectoras (por ejemplo ADCC, CDC, etc.) debido a diferencias en las
20 secuencias de aminoácidos de sus dominios Fc y/o bisagra, por ejemplo tal como se describe en Flesch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; Bruggemann *et al.* (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de dominio Fc variante puede usarse solo, o en combinación con una modificación de aminoácido, para afectar a la función efectora mediada por Fc y/o actividad de unión. En combinación, la modificación de aminoácido y región
25 Fc/bisagra de IgG pueden presentar una funcionalidad similar (por ejemplo, afinidad aumentada para FcγRIIA) y pueden actuar de manera aditiva o, más preferiblemente, de manera sinérgica para modificar la funcionalidad efectora en la molécula, en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural. En otras realizaciones, la modificación de aminoácido y región Fc de IgG pueden presentar funcionalidad opuesta (por ejemplo, afinidad aumentada y disminuida por FcγRIIA, respectivamente) y pueden actuar para atenuar o reducir
30 selectivamente una funcionalidad específica en la molécula, en relación con una molécula que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo natural del mismo isotipo.

- También se describen anticuerpos terapéuticos que se unen de manera inmuno-específica a FcγRIIB mediante sus dominios variables con mayor afinidad que FcγRIIA, por ejemplo, anticuerpos derivados de anticuerpo monoclonal de
35 ratón producido por el clon 2B6 o 3H7, que tiene los números de registro ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB se derivan de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, que tiene los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Se han depositado hibridomas que producen anticuerpos 2B6 y 3H7 ante la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 según lo dispuesto en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito
40 de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, y a los que se les asignaron los números de registro PTA-4591 (para el hibridoma que produce 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma que produce 3H7), respectivamente. Los hibridomas que producen 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 se depositaron según lo dispuesto en el Tratado de Budapest ante la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209)
45 el 7 de mayo de 2004, y a los que se les asignaron los números de registro PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FcγRIIB (por ejemplo, 2B6) comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante tiene una sustitución en la porción en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la
50 posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo 2B6 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo 2B6 que comprende una región Fc variante que
55 tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo 2B6 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

- También se describen anticuerpos terapéuticos que se unen al protooncogén Her2/neu (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31) (por ejemplo, anticuerpo Ab4D5 tal como se da a conocer en Carter *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9; patente estadounidense n.º 5.677.171; o publicación de solicitud de patente internacional WO 01/00245). En una realización determinada, el anticuerpo 4D5 es quimérico. En otra realización, el anticuerpo 4D5 está humanizado. En una realización específica, el anticuerpo 4D5 se modifica por ingeniería genética para que
60 comprenda una región Fc variante mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y/o
65 una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y/o

disminuye la afinidad de la región Fc por FcγRIIB y/o modula la función efectora del anticuerpo en relación con un anticuerpo comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En determinadas realizaciones, el anticuerpo 4D5 comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina.

- 5 También se describe un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396. También se describe un anticuerpo 4D5 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina. También se describe un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, y una leucina en la posición 300. También se describe un anticuerpo 4D5 que comprende una región Fc variante que tiene una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. También se describe un anticuerpo 4D5 que tiene una leucina en la posición 247, un ácido glutámico en la posición 292, y una lisina en la posición 421.

- 15 También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que no muestra una unión detectable a ningún FcγR (por ejemplo, no se une a FcγRIIA, FcγRIIB, o FcγRIIIA, tal como se determina mediante, por ejemplo, un ensayo ELISA), en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural.

- 20 También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIB. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIB. También se describe la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales antiinflamatorios o antiangiogénicos específicos) para potenciar la eficacia de anticuerpos terapéuticos potenciando, por ejemplo, la función efectora de los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, potenciando ADCC.

- En determinadas realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, modificación/modificaciones que altera(n) (en relación con una región Fc de tipo natural) la razón de afinidades de la región Fc variante con respecto a un FcγR activante (tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) en relación con un FcγR inhibidor (tal como FcγRIIB):

$$\text{Razón de afinidades} = \frac{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{activante}}}{\text{De tipo natural en relación con un cambio de variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{inhibidor}}}$$

- 40 Cuando una variante de Fc tiene una razón de afinidades mayor de 1, los métodos tienen uso particular para proporcionar un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad, trastorno o infección, o la mejora de un síntoma del mismo, donde se desea una eficacia potenciada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Cuando una variante de Fc tiene una razón de afinidades de menos de 1, los métodos tienen uso particular para proporcionar un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o trastorno, o la mejora de un síntoma del mismo, donde se desea una eficacia disminuida de la función celular efectora mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. La tabla 1 indica mutaciones individuales, dobles, triples, cuádruples y quintuples a modo de ejemplo según si su razón de afinidades es mayor o menor de 1. Los datos de la unión específica para diversas mutaciones se indican en la tabla 2, y puede encontrarse más información respecto a estas mutaciones en la técnica de tecnología de modificación por ingeniería genética de anticuerpos.

50

Tabla 1: Mutaciones individuales y múltiples a modo de ejemplo indicadas por razón de afinidades					
Razón	Individual	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
> 1	F243L	F243L y	F243L, P247L y	L234F, F243L, R292P y	L235V, F243L,
	D270E	R292P	N421K	Y300L	R292P, Y300L y P396L
	R292G	F243L y	F243L, R292P	L235I, F243L,	L235P, F243L,

		Y300L	y	Y300L	R292P y Y300L	
	R292P	F243L P396L	y	F243L, R292P y V305I	L235Q, F243L, R292P y Y300L	R292P, Y300L y P396L
		D270E P396L	y	F243L, R292P y P396L	F243L, P247L, D270E y N421K	F243L, R292P, V305I, Y300L
		R292P Y300L	y	F243L, Y300L y P396L	F243L, R255L, D270E y P396L	y P396L
		R292P V305I	y	P247L, D270E y N421K	F243L, D270E, G316D y R416G	
		R292P P396L	y	R255L, D270E y P396L	F243L, D270E, K392T y P396L	
		Y300L P396L	y	D270E, G316D y R416G	F243L, D270E, P396L y Q419H	
		P396L Q419H	y	D270E, K392T y P396L	F243L, R292P, Y300L, y P396L	
				D270E, P396L y Q419H	F243L, R292P, V305I y P396L	
				V284M, R292L y K370N	P247L, D270E, Y300L y N421K	
				R292P, Y300L y P396L	R255L, D270E, R292G y P396L	
					R255L, D270E, Y300L y P396L	
					D270E, G316D, P396L y R416G	
< 1	Y300L	F243L P396L	y	F243L, R292P y V305I		
	P396L	P247L N421K	y			
		R255L P396L	y			
		R292P V305I	y			
		K392T P396L	y			
		P396L Q419H	y			

Tabla 2: Información de unión detallada para variantes de Fc a modo de ejemplo

Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Razón de afinidades	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
Razón de afinidades > 1					
Clase I: Unión aumentada a CD16; unión disminuida a CD32B					
F243L	4,79	3,44	0,84	5,70	4,10
F243L P247L D270E N421K	2,30	3,45	0,32	7,19	10,78

ES 2 672 121 T3

F243L P247L N421K	1,89	1,71	0,17	11,12	10,06
F243L R255L D270E P396L	1,75	1,64	0,38	4,61	4,32
F243L D270E G316D R416G	1,50	1,34	0,20	7,50	6,70
F243L D270E K392T P396L	3,16	2,44	0,44	7,18	5,55
F243L D270E P396L Q419H	1,46	1,15	0,26	5,62	4,42
F243L R292P	4,73		0,12	39,4	
F243L R292P	4	1,67	0,16	25	10,44
F243L R292P P300L	6,69	2,3	0,32	20,9	7,19
F243L R292P V305I	2,56	1,43	ND	>25	>25
F243L R292P V305I P396L	5,37	2,53	0,40	13,43	6,33
P247L D270E N421K	1,89	2,46	0,58	3,26	4,24
R255L D270E R292G P396L	1,39	1,30	0,65	2,14	2,00
R255L D270E Y300L P396L	1,52	1,74	0,87	1,75	2,00
R255L D270E P396L	1,34	1,65	0,87	1,54	1,90
D270E	1,25	1,48	0,39	3,21	3,79
D270E G316D R416G	2,18	2,49	0,78	2,79	3,19
D270E K392T P396L	1,81	2,28	0,79	2,29	2,89
D270E P396L	1,38	1,65	0,89	1,55	1,85
D270E P396L G316D R416G	1,22		1,07	1,14	
D270E P396L Q419H	1,64	2,00	0,68	2,41	2,94
V284M R292P K370N	1,14	1,37	0,37	3,1	3,7
R292G	1,54		0,25	6,2	
R292P	2,90		0,25	11,60	
R292P V305I	1,32	1,28	0,37	3,6	3,46
Clase II: Unión disminuida a CD16; unión enormemente disminuida a CD32B					
R292P		0,64	0,25		2,56
R292P F243L		0,6	0,12		5,00
Clase III: Unión aumentada a CD16; unión inalterada a CD32B					
F243I R292P Y300L V305I P396L	10,9	3,12	1,05	10,4	2,97
F243L R292P Y300L P396L	10,06	5,62	1,07	9,40	5,25
R292P V305I P396L	1,85	1,90	0,92	2,01	2,07
Clase IV: Unión enormemente aumentada a CD16; unión aumentada a CD32B					
F243L R292P Y300L V305I P396L	10,06	8,25	1,38	7,29	5,98
D270E G316D P396L R416G	1,22		1,07	1,14	

Razón de afinidades < 1					
Clase V: Unión inalterada a CD16; unión aumentada a CD32B					
R255L P396L	1,09		2,22	0,49	
Y300L	1,01		1,18		0,99
Clase VI: Unión aumentada a CD16; unión enormemente aumentada a CD32B					
F243L P396L	1,49	1,60	2,22	0,67	0,72
P247L N421K	1,29	1,73	2,00	0,65	0,87
R255L P396L		1,39	2,22	0,49	0,63
R292P V305I	1,59	2,11	2,67	0,60	0,79
K392T P396L	1,49	1,81	2,35	0,63	0,77
P396L	1,27	1,73	2,58	0,49	0,67
P396L Q419H	1,19	1,19	1,33	0,89	0,89
Clase VII: Unión disminuida a CD16; unión aumentada/inalterada a CD32B					
D270E G316D P396L R416G		0,94	1,07		0,88

En otras realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc variante que tiene una o más sustituciones de aminoácido, sustituciones que alteran (en relación con una región Fc de tipo natural) la unión de la región Fc variante, por ejemplo, potencian la unión a un Fc γ R activante (tal como Fc γ RIIA o Fc γ RIIIA) y/o reducen la unión a un Fc γ R inhibitor (tal como Fc γ RIIB). Se modificaron por ingeniería genética diversas mutaciones de Fc que tenían uno o más cambios de aminoácido y se analizaron mediante resonancia de plasmón superficial para determinar k_{dis} , tal como se muestra en la tabla 3. Se determinaron las constantes de la tasa de disociación para la unión de diversos Fc γ R mediante análisis BIAcore y se compararon directamente con aquellas para la Fc de tipo natural, con la razón ($x = k_{dis}$ de WT / k_{dis} de mutante) indicada en las columnas de la derecha de la tabla 3 con respecto a cada Fc γ R sometido a prueba.

Tabla 3: Comparación de k_{dis} de mutantes de Fc con respecto a Fc de tipo natural												
M	Cambio(s) de aminoácidos							CD16A ^V	CD16A ^F	CD32A ^H	CD32B	
Un aminoácido												
1	F243L							4,8	3,4	0,6	0,8	
2		D270E						1,3	1,5	2,2	0,4	
3			R292P					2,4	1,6	0,7	0,3	
4				S298N				nd	nd	nt	0,2	
5					Y300L			1,0	1,2	2,9	1,2	
6						V305I		0,9	0,6	1,3	1,2	
7							A330V	0,6	1,2	0,4	0,3	
8							P396L	1,3	1,7	1,6	2,6	
Dos aminoácidos												
9	F243L						P396L	2,2	2,0	1,5	1,6	
10	F243L		R292P					4,0	1,7	0,5	0,2	
11			R292P			V305I		1,3	1,3	0,8	0,4	
Tres aminoácidos												
12	F243L		R292P		Y300L			7,4	4,6	1,0	0,6	
13	F243L		R292P			V305I		2,6	1,4	0,2	0,1	
14	F243L		R292P				P396L	6,3	3,4	1,4	0,4	
15			R292P			V305I	P396L	1,9	1,9	1,5	0,9	
Cuatro aminoácidos												
16	F243L		R292P		Y300L		P396L	10,1	5,6	1,7	1,1	
17	F243L		R292P			V305I	P396L	4,0	2,3	0,8	0,4	
Cinco aminoácidos8												
18	F243L		R292P		Y300L	V305I	P396L	10,1	8,3	3,2	1,4	
Abreviaturas: M, número de mutante; nd, unión no detectable; nt, no sometido a prueba. Los valores con diferencia ≥80% (≥0,8 veces) de tipo natural en cualquier dirección están en negrita. El sombreado indica mutantes de Fc identificados directamente mediante presentación visual de levaduras; todos los demás mutantes se construyeron mediante mutagénesis dirigida al sitio.												

También hay una amplia guía en la técnica de tecnología de modificación por ingeniería genética de anticuerpos respecto a modificaciones deseables. Las modificaciones a modo de ejemplo que pueden ser deseables en determinadas circunstancias se indican a continuación.

En una realización específica, en regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 ó 330 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: A240, 1240, L241, L243, H244, N298, 1328 o V330. En una

5 realización específica diferente, en regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, 1300 o L300.

10 En una realización preferida, en regiones Fc variantes que se unen a un FcγR con una afinidad alterada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Preferiblemente, la región Fc variante tiene cualquiera de los siguientes residuos: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 o A430.

15 En una realización diferente, en regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad reducida, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439.

20 En una realización diferente, en regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad potenciada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 ó 430. En una realización diferente, en regiones Fc variantes que se unen a FcγRIIA con una afinidad potenciada, cualquiera de los siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 o A430.

25 También se describe el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tal como las dadas a conocer en Jefferis *et al.* (2002) *Immunol Lett* 82:57-65; Presta *et al.* (2002) *Biochem Soc Trans* 30:487-90; Idusogie *et al.* (2001) *J Immunol* 166:2571-75; Shields *et al.* (2001) *J Biol Chem* 276:6591-6604; Idusogie *et al.* (2000) *J Immunol* 164:4178-84; Reddy *et al.* (2000) *J Immunol* 164:1925-33; Xu *et al.* (2000) *Cell Immunol* 200:16-26; Armour *et al.* (1999) *Eur J Immunol* 29:2613-24; Jefferis *et al.* (1996) *Immunol Lett* 54:101-04; Hinton *et al.*; 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6; Lund *et al.* (1996) *J Immunol* 157:4963-69; Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92:11980-84; Jefferis *et al.* (1995) *Immunol Lett.* 44:111-17; Lund *et al.* (1995) *FASEB J* 9:115-19; Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537-43; Lund *et al.* (1992) *Mol Immunol* 29:53-59; Lund *et al.* (1991) *J. Immunol* 147:2657-62; Duncan *et al.* (1988) *Nature* 332:563-64; patentes estadounidenses n.^{os} 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; y 7.317.091; y publicaciones PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

30 Las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 ó 332.

Particularmente las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos A-AI:

50 A. 228E, 228K, 228Y o 228G;

B. 230A, 230E, 230Y o 230G;

C. 231E, 231K, 231Y, 231P o 231G;

55 D. 232E, 232K, 232Y, 232G;

E. 233D;

F. 234I o 234F;

60 G. 235D, 235Q, 235P, 235I o 235V;

H. 239D, 239E, 239N o 239Q;

65 I. 240A, 240I, 240M o 240T;

ES 2 672 121 T3

- J. 243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H o 243I;
- K. 244H;
- 5 L. 245A;
- M. 247G, 247V o 247L;
- N. 262A, 262E, 262I, 262T, 262E o 262F;
- 10 O. 263A, 263I, 263M o 263T;
- P. 264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T o 264W;
- 15 Q. 265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N o 265Q;
- R. 266A, 266I, 266M o 266T;
- S. 271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W o 271G;
- 20 T. 273I;
- U. 275L o 275W;
- 25 V. 281D, 281K, 281Y o 281P;
- W. 284E, 284N, 284T, 284L, 284Y or 284M;
- 30 X. 291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I o 291G;
- Y. 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W o 299Y;
- 35 Z. 302I;
- AA. 304D, 304N, 304T, 304H o 304L
- AB. 305I;
- 40 AC. 313F;
- AD. 323I;
- 45 AE. 325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W o 325P;
- AF. 328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M o 328N;
- 50 AG. 330L, 330Y, 330I o 330V;
- AH. 332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G o 332Y; y
- 55 AI. 336E, 336K o 336Y.

Todavía más particularmente las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos 1-105 de la tabla 4:

Tabla 4			
Grupo	Variante	Grupo	Variante
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E

ES 2 672 121 T3

3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N

39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E.
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

La función efectora puede modificarse mediante técnicas tales como las descritas en la técnica de tecnología de modificación por ingeniería genética de anticuerpos, o mediante otros medios. Por ejemplo, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región, dando como resultado la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por el complemento aumentada y ADCC. Véase Caron et al. (1992) J. Exp Med. 176:1191-1195; y B. Shopes (1992) J. Immunol. 148:2918-2922. También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.* (1993) Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética que tiene regiones Fc duales y puede de ese modo tener capacidades de ADCC y lisis del complemento potenciadas. Stevenson *et al.* (1989) Anti-Cancer Drug Design 3:219-230.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas por un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR incluyendo pero sin limitarse a ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 6.2.2). Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas también se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones celulares efectoras de mediador de FcγR (véase la sección 6.2.2). En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tal como los descritos y dados a conocer en el presente documento) como aquellos en ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la descripción en el presente documento no excluye moléculas que no presentan el fenotipo deseado en ensayos basados *in vitro* pero presentan el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido en el dominio CH3 de la región Fc, que se define como que se extiende desde los aminoácidos 342-447. En otras realizaciones, las moléculas que comprenden una región Fc variante comprenden al menos una modificación de aminoácido en el dominio CH2 de la región Fc, que se define como que se extiende desde los aminoácidos 231-341. En algunas realizaciones, las moléculas comprenden al menos dos modificaciones de aminoácidos, en las que una modificación está en la región CH3 y una modificación está en la región CH2. También se describe una modificación de aminoácido en la región de bisagra. Las moléculas con una o más modificaciones de aminoácidos en los dominios CH2 y/o CH3 tienen afinidades alteradas por un FcγR tal como se determina usando los métodos descritos en el presente documento o conocidos por un experto en la técnica.

También se describe una modificación de aminoácido en el dominio CH1 de la región Fc.

También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante en las que dicha variante tiene una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A) y/o una actividad de ADCC aumentada, tal como se mide usando métodos conocidos por un experto en la técnica y ejemplificados en el presente documento. Los ensayos de ADCC usados según los métodos pueden ser dependientes de NK o dependientes de macrófagos.

Las variantes de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc conocidas incluyendo pero sin limitarse a modificaciones que alteran la función efectora y modificaciones que alteran la afinidad de unión a FcγR. En una

realización particular, una variante de Fc que comprende una primera modificación de aminoácido en el dominio CH3, dominio CH2 o la región de bisagra pueden combinarse con una segunda modificación de Fc de modo que la segunda modificación de Fc no está en el mismo dominio que la primera, de modo que la primera modificación de Fc confiere una propiedad aditiva, sinérgica o novedosa en la segunda modificación de Fc. En algunas realizaciones, las variantes de Fc no tienen ninguna modificación de aminoácido en el dominio CH2.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en posiciones que producen un contacto directo con FcγR basándose en análisis cristalográfico y estructural de interacciones Fc-FcγR tales como las dadas a conocer por Sondermann *et al.*, 2000 (Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que producen un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región de bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G). En algunas realizaciones, las moléculas que comprenden regiones Fc variantes comprenden modificación de al menos un residuo que produce un contacto directo con un FcγR basándose en análisis estructural y cristalográfico.

El dominio de interacción de FcγR se mapea con la región de bisagra inferior y selecciona sitios dentro de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG. Los residuos de aminoácido que flanquean las posiciones de contacto reales y los residuos de aminoácido en el dominio CH3 desempeñan un papel en las interacciones IgG/FcγR tal como se indica mediante estudios de mutagénesis y estudios que usan inhibidores de péptidos pequeños, respectivamente (Sondermann *et al.*, 2000 Nature, 406: 267-273; Diesenhofer *et al.*, 1981, Biochemistry, 20: 2361-2370; Shields *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Contacto directo tal como se usa en el presente documento se refiere a aquellos aminoácidos que están dentro de al menos 1 Å, al menos 2, o al menos 3 angstrom entre sí o dentro de 1 Å, 1,2 Å, 1,5 Å, 1,7 Å o 2 Å de radio de Van Der Waals.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR mediante la región Fc con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural, siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR mediante la región Fc con una afinidad alterada en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural, siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 y no tiene una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326 ó 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335 una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante no tiene o no es únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439 y no tiene una histidina, glutamina, o tirosina en la posición 280; una serina, glicina, treonina o tirosina en la posición 290, una leucina o isoleucina en la posición 300; una asparagina en la posición 294, una prolina en la posición 296; una prolina, asparagina, ácido aspártico, o valina en la posición 298; una lisina en la posición 295. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR mediante la región Fc con una afinidad reducida en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de manera que dicha molécula se une a un FcγR mediante la región Fc con una afinidad potenciada en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo natural siempre que dicha región Fc variante no

tenga o no sea únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 ó 430.

- 5 También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante no incluye o no es únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269 ó 328 y no tiene una leucina en la posición 243, una asparagina en la posición 298, una leucina en la posición 241, y isoleucina o una alanina en la posición 240, una histidina en la posición 244, una valina en la posición 330, o una isoleucina en la posición 328.
- 10 En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas con afinidades alteradas por receptores activantes y/o inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en las que dicha una o más modificaciones de aminoácido es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina, y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina, y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina.

- 35 También se describe una molécula que comprende una región Fc variante en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 396 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico y en la posición 243 con leucina. En otra realización específica la molécula comprende además una o más modificaciones de aminoácido tal como se da a conocer en el presente documento.

- 40 También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante que tiene una modificación de aminoácido en una o más de las siguientes posiciones: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 217, 219, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 288, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 273, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 295, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446, 447. Preferiblemente tales mutaciones dan como resultado moléculas que tienen una afinidad alterada por un FcγR y/o tienen una función mediada por células efectoras alterada tal como se determina usando los métodos y datos a conocer y ejemplificados en el presente documento y conocidos por un experto en la técnica.

- 55 En algunas realizaciones, las moléculas, preferiblemente las inmunoglobulinas comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de modo que uno o más restos hidrato de carbono están unidos de manera covalente a la molécula. Preferiblemente, los anticuerpos con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpos potenciada, por ejemplo, actividad de ADCC potenciada. También se describen anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe directa o indirectamente que interactúan con un resto hidrato de carbono del anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directa o indirectamente con un resto hidrato de carbono de un anticuerpo se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Jefferis *et al.*, 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

- 65 La glicosilación es una modificación cotraduccional/postraduccional que da como resultado la unión de un oligosacárido de manosa con glucosilación elevada (GlcNAc₂Man₉Glu₃), que se procesa posteriormente, en primer lugar a una estructura GlcNAc₂Man₉ ("Man9") (figura 41), y luego sucesivamente para producir una estructura GlcNAc₂Man₈ ("Man8"), GlcNAc₂Man₇ ("Man7"), GlcNAc₂Man₆ ("Man6") y en última estancia, una estructura

GlcNAc₂Man₅ ("Man5"). Luego se procesa la estructura GlcNAc₂Man₅ ("Man5") mediante la acción sucesiva de glicosiltransferasas para generar un oligosacárido "G0F," "G1F" y "G2F" que presenta una estructura diantenaria compleja (figura 42) (Jefferis, R. (2005) "Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics," Biotechnol. Prog. 21:11-16; Kornfeld, R. *et al.* (1985) "Assembly Of Asparagine-Linked Oligosaccharides," Ann. Rev. Biochem. 54:631-664).

También se describen anticuerpos que se han modificado introduciendo uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, actividad de unión a FcγR. Pueden introducirse sitios de glicosilación en la región variable y/o constante de los anticuerpos. Tal como se usa en el presente documento, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo a la que un oligosacárido (es decir, hidratos de carbono que contienen dos o más monosacáridos unidos entre sí) se unirán específicamente y de manera covalente. Las cadenas laterales de oligosacáridos se unen normalmente a la estructura principal de un anticuerpo mediante o bien enlaces N o bien O. La glicosilación unida a N se refiere a la unión de un resto oligosacárido con la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de un resto oligosacárido con un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Los anticuerpos pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluyendo sitios de glicosilación ligados N o ligados O. Puede usarse cualquier sitio de glicosilación para glicosilación unida a N o unida a O conocida en la técnica. Un sitio de glicosilación unido a N a modo de ejemplo que es útil según los métodos, es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Tal sitio o sitios pueden introducirse en un anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica a la que pertenece esta descripción. Véase, por ejemplo, "*In vitro* Mutagenesis," Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, *et al.* W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116. Un método a modo de ejemplo para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo que se obtiene la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

También se describen métodos de modificación del contenido en hidratos de carbono de un anticuerpo añadiendo o delecionando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido en hidratos de carbono de anticuerpos se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.218.149; el documento EP 0 359 096 B1; la publicación estadounidense n.º US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la publicación estadounidense n.º 2003/0115614; la patente estadounidense n.º 6.218.149; la patente estadounidense n.º 6.472.511. También se describen métodos de modificación del contenido en hidratos de carbono de un anticuerpo delecionando uno o más restos hidrato de carbono endógenos del anticuerpo. La descripción abarca desplazar el sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando la posición 297 (por ejemplo, de asparagina a un residuo sin un grupo amina disponible, por ejemplo, glutamina) y/o las posiciones adyacentes a 297. También se describe modificar la posición 296 de modo que la posición 296 y no la posición 297 se glicosila.

Están implicadas estructuras de hidratos de carbono fucosiladas en una variedad de procesos biológicos y patológicos en organismos eucariotas incluyendo desarrollo tisular, angiogénesis, fertilización, adhesión celular, inflamación y metástasis tumoral (Ma, B. *et al.* (Epub, 14 de septiembre de 2006) "Fucosylation in Prokaryotes And Eukaryotes," Glycobiology. 16(12): 158R-184R). Se ha encontrado que los anticuerpos terapéuticos que carecen completamente de la fucosa central de los oligosacáridos de Fc presentan una ADCC mucho mayor en seres humanos que sus homólogos fucosilados (Iida, S. *et al.* (2009) "Two Mechanisms Of The Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Eficacia Of Non-Fucosylated Therapeutic Antibodies In Human Blood," BMC Cancer. 18:9:58). Sin embargo, la producción de tales anticuerpos ha requerido previamente la eliminación enzimática de residuos de fucosa (por ejemplo, usando N-glicosidasa F) que se habían añadido a los anticuerpos mediante una glicosilasa.

Un aspecto de la presente invención se refiere al reconocimiento de que variaciones en la región Fc de un anticuerpo pueden interferir con el mecanismo de glicosilación celular y producir de ese modo anticuerpos que presentan un grado disminuido de glicosilación (y en particular, de fucosilación).

La descripción en el presente documento proporciona por tanto un medio para producir anticuerpos que tienen un grado disminuido de glicosilación (y en particular, de fucosilación) sustituyendo uno, o más dos, tres, cuatro, cinco o más de los residuos de Fc nativos para formar una región Fc variante. Sin pretender limitarse a ninguna teoría del mecanismo de acción, se cree que sustituciones adecuadas producen un polipéptido que tiene una región Fc variante que está o bien menos fucosilada que una región de Fc nativa, o bien que no está fucosilada en absoluto, y que tales polipéptidos, debido a su grado alterado (o ausente) de glicosilación (y en particular, de fucosilación) presentan un función efectora mejorada, en relación con polipéptidos que tienen una región de Fc nativa. Los polinucleótidos que codifican para polipéptidos que comprenden tales regiones Fc variantes pueden, por tanto, introducirse en células huésped (por ejemplo, células CHO, levadura, etc.), incluyendo células huésped que puede mediar glicosilación normal (y en particular, fucosilación normal), pero se expresarán como polipéptidos que están menos modificados postraduccionalmente por glicosilasa (o fucosilasa) o que no están postraduccionalmente modificados por tales enzimas, en relación con polipéptidos que comprenden regiones Fc nativas y presentan de ese modo, una función efectora mejorada (por ejemplo, unión mejorada a los receptores activantes (por ejemplo, CD16A, CD32A) y unión reducida a CD32B. Tal mejora de la función efectora puede medirse usando un análisis de la tasa de disociación. Tal análisis proporcionar el mejor indicador para la posible mejora de una actividad de unión a FcγR

in vivo porque como variable cinética, refleja directamente la interacción Fc-FcγR independiente de la concentración de anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, tal grado disminuido de glicosilación (y en particular, de fucosilación) es preferiblemente menos del 80%, más preferiblemente menos del 60%, todavía más preferiblemente menos del 40%, y lo más preferiblemente menos del 20% del grado de glicosilación (y en particular, de fucosilación) presentado por tal anticuerpo en ausencia de tal variación en su región Fc. En una realización más preferida, tales variaciones en la región Fc del anticuerpo eliminarán sustancialmente o eliminarán completamente el grado de glicosilación (y en particular, de fucosilación) presentado por tal anticuerpo. La capacidad de tales variantes de Fc para disminuir el grado de glicosilación (y en particular, de fucosilación) es una característica general y se ejemplifica en el presente documento con respecto a anticuerpos anti-Her2/neu.

También se describen polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) que presentan regiones Fc variantes que dan como resultado una razón potenciada de glicosilación de oligosacárido con alto contenido en manosa con respecto a glicosilación de oligosacárido complejo. Tal como se usa en el presente documento, una razón de este tipo denota una comparación del grado al cual la glicosilación presentada por una región Fc es un oligosacárido complejo de o bien G0F, G1F o bien G2F (véase la figura 42) en relación con el grado al cual la glicosilación presentada por una región Fc es Man5, Man6, Man7, Man8 o Man9 (véase la figura 41). La razón de glicosilación de oligosacárido con alto contenido en manosa con respecto a la glicosilación de oligosacárido complejo es por tanto:

$$\Sigma (\% \text{ Man5} + \% \text{ Man6} + \% \text{ Man7} + \% \text{ Man8} + \% \text{ Man9}) : \Sigma (\% \text{ G0F} + \% \text{ G1F} + \% \text{ G2F}).$$

Preferiblemente, la razón potenciada de glicosilación de oligosacárido con alto contenido en manosa con respecto a glicosilación de oligosacárido complejo será mayor de aproximadamente 0,2. Más preferiblemente, esta razón será mayor de aproximadamente 0,5, todavía más preferiblemente esta razón será mayor de aproximadamente 1,0, mayor de aproximadamente 1,5, mayor de aproximadamente 2,0, mayor de aproximadamente 2,5, mayor de aproximadamente 3,0, mayor de aproximadamente 3,5, mayor de aproximadamente 4,0, mayor de aproximadamente 4,5, mayor de aproximadamente 5,0, mayor de aproximadamente 5,5, o mayor de 6,0. Lo más preferiblemente, los intervalos superiores de tal razón serán menor de aproximadamente 10, más preferiblemente, menor de aproximadamente 9,5, menor de aproximadamente 9, menor de aproximadamente 8,5, menor de aproximadamente 8, menor de aproximadamente 7,5, menor de aproximadamente 7, menor de aproximadamente 6,5, menor de aproximadamente 6, o menor de aproximadamente 5,5. Los intervalos contemplados específicos de tal razón incluyen mayor de aproximadamente 0,2 pero menor de aproximadamente 5,5; mayor de aproximadamente 0,5 pero menor de aproximadamente 5,5; mayor de aproximadamente 1,0 pero menor de aproximadamente 5,5; mayor de aproximadamente 2,0 pero menor de aproximadamente 5,5; mayor de aproximadamente 3,0 pero menor de aproximadamente 5,5; mayor de aproximadamente 4,0 pero menor de aproximadamente 5,5; y mayor de aproximadamente 5,0 pero menor de aproximadamente 5,5.

Preferiblemente, las variantes de Fc que presentan un grado disminuido de glicosilación (y en particular, de fucosilación) comprenden una sustitución de aminoácido de cualquiera o ambas de las posiciones L234 y/o L235. Más preferiblemente, tales variantes de Fc comprenderán además al menos una sustitución de aminoácido adicional en cualquiera o todas de las posiciones: F243, R292, Y300, V305 y/o P396. Por tanto, variantes preferidas de Fc que presentan un grado disminuido de glicosilación (y en particular, de fucosilación) comprenden sustituciones de aminoácido en cualquiera o ambas de las posiciones L234 y/o L235, y también en la posición F243; posición R292; posición Y300; posición V305; posición P396; posiciones F243 y R292; posiciones F243 y Y300; posiciones F243 y V305; posiciones F243 y P396; posiciones R292 y Y300; posiciones R292 y V305; posiciones R292 y P396; posiciones Y300 y V305; posiciones Y300 y P396; posiciones V305 y P396; posiciones F243, R292 y Y300; posiciones F243, R292 y V305; posiciones F243, Y300 y V305; posiciones F243, Y300 y P396; posiciones F243, V305 y P396; posiciones R292, Y300 y V305, posiciones R292, Y300 y P396; posiciones R292, V305 y P396; posiciones Y300, V305 y P396; posiciones F243, R292, Y300 y V305; posiciones F243, R292, Y300 y P396; posiciones F243, R292, V305 y P396; posiciones F243, Y300, V305 y P396; posiciones R292, Y300, V305 y P396; o posiciones F243, R292, Y300, V305 y P396. Las sustituciones de L234, L234F, y/o la sustitución de L235, L235V, se prefieren particularmente.

6.1 POLIPÉPTIDOS Y ANTICUERPOS CON REGIONES Fc VARIANTES

Un experto en la técnica apreciará que además de las sustituciones de aminoácido, la presente descripción contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región Fc con el fin de generar una variante de región Fc con una o más propiedades alteradas, por ejemplo, función efectora alterada. La descripción contempla delección de uno o más residuos de aminoácido de la región Fc con el fin de reducir la unión a un FcγR. Preferiblemente, no más de 5, no más de 10, no más de 20, no más de 30, no más de 50 residuos de la región Fc se delecionarán según esta realización. La región Fc en el presente documento que comprende una o más delecciones de aminoácido conservará preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, de la región Fc de tipo

natural. En algunas realizaciones, una o más propiedades de las moléculas se mantienen tal como por ejemplo, no inmunogenicidad, unión a FcγRIIIA, unión a FcγRIIA, o una combinación de estas propiedades.

También se describe una inserción de aminoácido para generar las variantes de la región Fc, variantes que tienen propiedades alteradas incluyendo función efectora alterada. También se describe la introducción de al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo, de uno a dos residuos de aminoácido y preferiblemente no más de 10 residuos de aminoácido adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc identificadas en el presente documento. También se describe la introducción de al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo, de uno a dos residuos de aminoácido y preferiblemente no más de 10 residuos de aminoácido adyacentes a una o más de las posiciones de la región Fc conocidas en la técnica como unión y/o interacción FcγR de impacto.

También se describe la incorporación de aminoácidos no naturales para generar las variantes de Fc. Tales métodos los conocen expertos en la técnica tal como aquellos que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 2002 Chem. Comm. 1: 1-11; Wang *et al.*, 2001, Science, 292: 498-500; van Hest *et al.*, 2001. Chem. Comm. 19: 1897-1904. Estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoacil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang *et al.*, 2001, J. Am. Chem. 123(44): 11089-11090; Kiick *et al.*, 2001, FEBS Lett. 505(3): 465.

Las afinidades y propiedades de unión de las variantes de Fc, o fragmentos de las mismas, de uso se determinan inicialmente usando un sistema de presentación visual de levaduras, preferiblemente en combinación con ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR incluyendo pero sin limitarse a ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 6.2.1). En determinadas realizaciones, se incorporan además variantes de Fc candidatas identificadas usando el sistema de presentación visual de levaduras en un anticuerpo o fragmento del mismo para someter a prueba en dicho ensayo *in vitro*. Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas también se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones celulares efectoras de mediador de FcγR (véase la sección 6.2.5). Tales métodos se han dado a conocer previamente por los inventores, véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351, y se han usado para identificar y caracterizar mutaciones de Fc novedosas basándose en características de unión a FcγRIIIA y FcγRIIB, véase, por ejemplo, la tabla 5.

TABLA 5				
MUTACIONES DE Fc IDENTIFICADAS USANDO PRESENTACIÓN VISUAL DE LEVADURAS Y ENSAYO ELISA				
Clon n.º	Sitios de mutación	Dominio	Unión a IIIA	Unión a IIB
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1, bisagra, CH2, CH3	sin cambio	-
12	K290E, L142P	CH1, CH2	+	no sometido a prueba
16	A141V, H268L, K288E, P291S	CH1, CH2	-	no sometido a prueba
19	L133M, P150Y, K205E, S383N, N384K	CH1, CH2, CH3	-	no sometido a prueba
21	P396L	CH3	•	•+
25	P396H	CH3	•••	••
6	K392R	CH3	sin cambio	sin cambio
15	R301C, M252L, S192T	CH1, CH2	-	no sometido a prueba
17	N315I	CH2	sin cambio	no sometido a prueba
18	S132I	CH1	sin cambio	no sometido a prueba
26	A162V	CH1	sin cambio	no sometido a

ES 2 672 121 T3

				prueba
27	V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T	CH1, Ch2	+	+
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	no sometido a prueba
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1, CH2, CH3	+	sin cambio
31	K409R, S166N	CH1, CH3	sin cambio	no sometido a prueba
20	S408I, V215I, V125I	CH1, bisagra, CH3	+	sin cambio
24	G385E, P247H	CH2, CH3	...	+
16	V379M	CH3	..	sin cambio
17	S219Y	Bisagra	•	-
18	V282M	CH2	•	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	sin cambio
35	D401V	CH3	+	sin cambio
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	Bisagra	•	sin cambio
41	K246T, Y319F	CH2	•	sin cambio
42	F243I, V379L	CH2, CH3	•+	-
43	K334E	CH2	•+	-
44	K246T, P396H	CH2, CH3	•	••+
45	H268D, E318D	CH2	•+	
49	K288N, A330S, P396L	CH2, CH3		...
50	F243L, R255L, E318K	CH2	•	-
53	K334E, T359N, T366S	CH2, CH3	•	sin cambio
54	I377F	CH3	•+	+
57	K334I	CH2	•	sin cambio
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2, CH3	•+	•+
59	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2,CH3	•+	sin cambio
61	I377F (aislado independiente)	CH3	...	••+
62	P247L	CH2	..	••+
64	P217S, A378V, S408R	Bisagra, CH3	..	+
65	P247L, I253N, K334N	CH2	...	••+
66	K288M, K334E	CH2	...	-
67	K334E, E380D	CH2, CH3	•+	-
68	P247L (aislado independiente)	CH2	+	
69	T256S, V305I, K334E, N390S	CH2, CH3	•+	sin cambio
70	K326E	CH2	•+	••+
71	F372Y	CH3	+	+
72	K326E (aislado independiente)	CH2	+	..
74	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2, CH3	..	sin cambio

75	K334E (aislado independiente)	CH2	••+	sin cambio
76	P396L (aislado independiente)	CH3	•+	sin cambio
78	K326E (aislado independiente)	CH2	••	•••+
79	K246I, K334N	CH2	•	••••
80	K334E (aislado independiente)	CH2	•	sin cambio
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L	CH2, CH3	•	sin cambio
82	K320E, K326E	CH2	•	•
84	H224L	Bisagra	•	•••••
87	S375C, P396L	CH3	•+	••••+
89	E233D, K334E	CH2	•+	sin cambio
91	K334E (aislado independiente)	CH2	•	sin cambio
92	K334E (aislado independiente)	CH2	•	sin cambio
94	K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	•	sin cambio
en relación con una molécula comparable con región Fc de tipo natural, • ≡ aumento de afinidad de 1 vez; + ≡ aumento de afinidad de hasta el 50%; y - = disminución de afinidad de 1 vez				

En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tal como los dados a conocer en el presente documento y/o conocidos en la técnica) como las de ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente descripción no excluye moléculas que no presentan el fenotipo deseado en ensayos basados *in vitro* pero presentan el fenotipo deseado *in vivo*. Se describe un diagrama de flujo representativo del examen y caracterización de moléculas en la figura 1.

También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante que se une con una mayor afinidad a uno o más FcγR. Tales moléculas median preferiblemente una función efectora más eficazmente tal como se comenta a continuación. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante que se unen con una afinidad más débil a uno o más FcγR. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos por ejemplo en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica bloqueo o antagonismo pero sin destruir las células que portan un antígeno diana. La reducción o eliminación de la función efectora sería deseable en casos de enfermedad autoinmunitaria en los que se bloquearían receptores activantes FcγR en células efectoras. (Este tipo de función estaría presente en las células del huésped). En general, la función efectora aumentada se dirigiría a células tumorales y foráneas.

Las variantes de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, incluyendo pero sin limitarse a modificaciones que altera la función efectora. También se describe combinar una variante de Fc descrita en el presente documento con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferiblemente las variantes de Fc potencian el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante de Fc se combina con un mutante que se sabe que se une a FcγRIIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural; la combinación con un mutante descrito en el presente documento da como resultado un potenciamiento en veces mayor en la afinidad por FcγRIIIA.

En una realización, las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden combinarse con otras variantes de Fc conocidas tales como las dadas a conocer en Duncan *et al*, 1988, Nature 332:563-564; Lund *et al*, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund *et al*, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre *et al*, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al*, 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis *et al*, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund *et al*, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis *et al*, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund *et al*, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour *et al*, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie *et al*, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy *et al*, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu *et al*, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie *et al*, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields *et al*, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis *et al*, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta *et al*, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; documento US 5.624.821; documento US 5.885.573; documento US 6.194.551; documento PCT WO 00/42072; documento PCT WO 99/58572.

En algunas realizaciones, las variantes de Fc se incorporan en un anticuerpo o fusión de Fc que comprende una o más glicoformas modificadas por ingeniería genética, es decir, una composición de hidrato de carbono que se une de manera covalente a una molécula que comprende una región Fc, en la que dicha composición de hidrato de carbono difiere químicamente de la de una molécula original que comprende una región Fc. Las glicoformas

modificadas por ingeniería genética pueden ser útiles para una variedad de fines, incluyendo pero sin limitarse a potenciar o reducir la función efectora. Las glicoformas modificadas por ingeniería genética pueden generarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo usando cepas de expresión variante o modificadas por ingeniería genética, mediante coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTII1), expresando una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando hidrato(s) de carbono después de que se haya expresado la molécula que comprende la región Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar glicoformas modificadas por ingeniería genética, e incluyen pero no se limitan a los descritos en Umana *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) documentos US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de modificación por ingeniería genética de glicosilación GlycoMab™ (biotecnología GLYCART AG, Zúrich, Suiza). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki *et al.*, 2004, JMB, 336: 1239-49.

Las variantes de Fc pueden optimizarse para una variedad de propiedades. Las propiedades que pueden optimizarse incluyen pero no se limitan a afinidad potenciada o reducida por un FcγR, función efectora potenciada o reducida. En una realización preferida, las variantes de Fc se optimizan para que posean afinidad potenciada por un FcγR activante humano, preferiblemente FcγR, FcγRIIA, FcγRIIc, FcγRIIIA y FcγRIIIB, lo más preferiblemente FcγRIIIA. En una realización preferida alternativa, las variantes de Fc se optimizan para que posean afinidad reducida por el receptor inhibitor humano FcγRIIB. Se anticipa que estas realizaciones preferidas proporcionen anticuerpos y fusiones de Fc con propiedades terapéuticas potenciadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora potenciada y mayor potencia anticancerígena tal como se describe y ejemplifica en el presente documento. Se anticipa que estas realizaciones preferidas proporcionen anticuerpos y fusiones de Fc con eliminación de tumores potenciada en modelos de tumor de xenoinjerto de ratón.

En una realización alternativa, las variantes de Fc se optimizan para que tengan afinidad reducida por un FcγR humano, incluyendo pero sin limitarse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIc, FcγRIIIA y FcγRIIIB. Se anticipa que estas realizaciones proporcionan anticuerpos y fusiones de Fc con propiedades terapéuticas potenciadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora reducida y toxicidad reducida.

En realizaciones alternativas, las variantes de Fc presentan afinidad potenciada o reducida por FcγR de organismos no humanos, incluyendo pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos y monos. Las variantes de Fc que se optimizan para la unión a un FcγR no humano, pueden utilizarse en experimentación. Por ejemplo, están disponibles modelos de ratón para una variedad de enfermedades que permiten someter a prueba propiedades tales como eficacia, toxicidad y farmacocinética para un candidato a fármaco dado. Tal como se conoce en la técnica, pueden injertarse o inyectarse células cancerosas en ratones para imitar un cáncer humano, un procedimiento denominado xenoinjerto. Someter a prueba anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden variantes de Fc que se optimizan para uno o más FcγR de ratón, puede proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia del anticuerpo o fusión de Fc, su mecanismo de acción, y similares. En determinadas realizaciones, se someten a prueba moléculas que comprenden una región Fc humana variante en ratones transgénicos que expresan uno o más receptores de Fcγ humanos (por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIIB).

Aunque se prefiere alterar la unión a un FcγR, la presente descripción contempla además variantes de Fc con afinidad de unión alterada al receptor neonatal (FcRn). Aunque sin pretender restringirse a un mecanismo de acción particular, se anticipa que las variantes de la región Fc con afinidad mejorada por FcRn tengan semividas séricas más largas, y tales moléculas tendrán aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos en donde se desea una semivida larga del polipéptido administrado, por ejemplo, para tratar un trastorno o enfermedad crónica. Aunque sin pretender restringirse a un mecanismo de acción particular, las variantes de la región Fc con afinidad disminuida por FcRn, al contrario, se espera que tengan semividas más cortas, y tales moléculas pueden, por ejemplo, administrarse a un mamífero en donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, por ejemplo, para obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo* o para polipéptidos que tienen efectos secundarios tóxicos cuando se dejan circulando en el torrente sanguíneo durante periodos prolongados. Se anticipa que las variantes de la región Fc con afinidad de unión por FcRn disminuida sean menos probables de atravesar la placenta, y por tanto pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas.

En otras realizaciones, estas variantes pueden combinarse con otras modificaciones de Fc conocidas con afinidad por FcRn alterada tal como las dadas a conocer en las publicaciones internacionales n.^{os} WO 98/23289 y WO 97/34631; y la patente estadounidense n.^o 6.277.375.

Puede usarse cualquier otro método conocido en la técnica para generar anticuerpos que tienen una semivida aumentada *in vivo*, por ejemplo, introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o deleciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un fragmento de dominio Fc-bisagra o Fc). Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.^{os} WO 98/23289 y WO 97/34631; y la patente estadounidense n.^o 6.277.375 que van a usarse en combinación con las variantes de

Fc. Además, los anticuerpos pueden conjugarse con albúmina con el fin de producir el anticuerpo o fragmento de anticuerpo más estable *in vivo* o tener una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas bien conocidas en la técnica, véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.^{os} WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137, y la patente europea n.^o EP 413,622.

La(s) variante(s) descrita(s) en el presente documento puede(n) someterse a modificaciones adicionales, a menudo según el uso previsto de la variante. Tales modificaciones pueden implicar alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o delección de residuos de aminoácido), fusión con polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Tales modificaciones adicionales pueden realizarse antes de, simultáneamente con, o tras, la(s) modificación/modificaciones de aminoácido dada(s) a conocer en el presente documento que da(n) como resultado propiedades alteradas tales como una alteración de la unión al receptor de Fc y/o actividad de ADCC.

También se describe la combinación de las modificaciones de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento con una o más modificaciones adicionales de aminoácidos que alteran la unión a C1q y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento de la región Fc tal como se determina *in vitro* y/o *in vivo*. Preferiblemente, la molécula de partida de particular interés en el presente documento es habitualmente una que se une a C1q y presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácido adicionales descritas en el presente documento servirán generalmente para alterar la capacidad de la molécula de partida de unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, para reducir y preferiblemente suprimir estas funciones efectoras. En otras realizaciones, en el presente documento se contemplan moléculas que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con unión a C1q mejorada y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo, la molécula de partida puede no poder unirse a C1q y/o mediar CDC y puede modificarse según las enseñanzas en el presente documento de modo que adquiere estas funciones efectoras adicionales. Además, moléculas con actividad de unión a C1q preexistente, que tienen además opcionalmente la capacidad de mediar CDC pueden modificarse de modo que se alteran una o ambas de estas actividades, por ejemplo, se potencian. También se describen regiones Fc variantes con actividad de CDC alterada sin ninguna alteración en unión a C1q. También se describen regiones Fc variantes con actividad de CDC alterada y unión a C1q alterada.

Para generar una región Fc con unión a C1q alterada y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), las posiciones de aminoácido que van a modificarse se seleccionan generalmente de las posiciones 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 y 334, en donde la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice de la UE como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (199). Estas modificaciones de aminoácidos pueden combinarse con una o más modificaciones de Fc dadas a conocer en el presente documento para proporcionar un efecto sinérgico o aditivo en la unión a C1q y/o actividad de CDC. También se describen variantes de Fc con unión a C1q alterada y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 255 con leucina; o una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 419 con histidina; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 370 con ácido glutámico; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 240 con alanina; una sustitución de aminoácido en la posición 396 con leucina y en la posición 392 con treonina; una sustitución de aminoácido en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina. Puede usarse cualquier modificación conocida de la región Fc que altera la unión a C1q y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), tal como las dadas a conocer en Idusogie *et al.*, 2001, J. Immunol. 166(4) 2571-5; Idusogie *et al.*, J. Immunol. 2000 164(8): 4178-4184.

También se describe una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, unión a C1q y/o unión a FcR modificadas y de ese modo, actividad de CDC y/o actividad de ADCC alteradas. También se describen regiones Fc variantes con unión a C1q mejorada y unión a FcγRIII mejorada; por ejemplo que tienen tanto actividad de ADCC mejorada como actividad de CDC mejorada. También se describe una región Fc variante con actividad de CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras realizaciones, puede aumentarse sólo una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, por ejemplo para generar una variante de región Fc con actividad de ADCC mejorada, pero actividad de CDC reducida y viceversa.

6.1.1 MUTANTES CON AFINIDADES ALTERADAS POTENCIADAS PARA FcγRIIIA y/o FcγRIIA

También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, en las que tales modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante por un FcγR activante. En algunas realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En otra realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por

FcγRIIIA y/o FcγRIIA en más de 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. La una o más modificaciones de aminoácidos pueden aumentar la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. La una o más modificaciones de aminoácidos pueden disminuir la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. Tales aumentos en veces se determinan preferiblemente mediante un ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución en una cualquiera de las posiciones 329, 331 ó 322 con cualquier aminoácido. En determinadas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución con una cualquiera de alanina en las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360 ó 430; con lisina en la posición 330; con treonina en la posición 339; con metionina en la posición 320; con serina, asparagina, ácido aspártico, o ácido glutámico en la posición 326 con glutamina, ácido glutámico, metionina, histidina, valina, o leucina en la posición 334. En otra realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 290, 300, 294 ó 295. En otra realización más específica, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución en la posición 300 con leucina o isoleucina; en la posición 295 con lisina; en la posición 294 con asparagina; en la posición 298 con ácido aspártico, prolina, asparagina, o valina; en la posición 280 con histidina, glutamina o tirosina; en la posición 290 con serina, glicina, treonina o tirosina.

También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA mediante su región Fc con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272 ó 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina, o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico, o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en posición 322; una serina, ácido glutámico, o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301. En una realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. En otra realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en más de 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. La una o más modificaciones de aminoácidos pueden aumentar la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural.

También se describen moléculas, preferiblemente polipéptidos, y más preferiblemente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones pero incluyendo también inserciones o deleciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 150%, y al menos el 200%, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural.

En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante por uno o más FcγR activante comprenden una sustitución en la posición 347 con histidina, y en la posición 339 con valina; o una sustitución en la posición 425 con isoleucina y en la posición 215 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina, y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, en la posición 202 con metionina, y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 275 con isoleucina, en la posición 334 con asparagina, y en la posición 348 con metionina; o una sustitución en la posición 279 con leucina y en la posición 395 con serina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 319 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 255 con leucina y en la posición 318 con lisina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 380 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 256 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 390 con serina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina, en la posición 394 con metionina, y en la posición 424 con leucina; o una sustitución en la posición 233 con ácido aspártico y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, en la posición 366 con serina, y en la posición 386 con arginina; o una sustitución en la posición 246 con

- treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la
- 5 posición 217 con serina, en la posición 378 con valina, y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina, y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina, y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la
- 10 posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con isoleucina; o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con
- 15 posición 234 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 270 con ácido glutámico, y en la posición 421 con lisina. A continuación se dan a conocer y se resumen en la tabla 3 ejemplos de otras sustituciones de aminoácido que dan como resultado una afinidad potenciada por FcγRIIIA *in vitro*.
- 20 También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1,5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc
- 25 variante comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con leucina y en
- 30 la posición 255 con leucina de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1 vez mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con
- 35 aproximadamente una afinidad 1,5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 3 veces mayor que con la que una molécula comparable que
- 40 comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1,5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a
- 45 FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1 vez mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una
- 50 molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2,5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc
- 55 variante comprende una sustitución en la posición 247 con leucina, y en la posición 421 con lisina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 3 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina de manera que
- 60 dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 4,5 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico, y en la posición 327 con treonina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1,5

veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA. También se describe una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2 veces mayor que con la que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural se une a FcγRIIIA, tal como se determina mediante un ensayo ELISA.

[illegible]

relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 414 con asparagina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 225 con serina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 377 con asparagina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 243 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 292 con prolina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 300 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 305 con isoleucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 273 con fenilalanina.

También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2 veces mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 379 con metionina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 1,5 veces mayor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 248 con metionina.

En algunas realizaciones, las moléculas tienen una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tal como se determina usando ensayos *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR incluyendo pero sin limitarse a ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la sección 6.2.5.1). Preferiblemente, las propiedades de unión de estas moléculas con afinidades alteradas por receptores de FcγR activantes también se correlacionan con su actividad tal como se determina mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones celulares efectoras de mediador de FcγR (véase la sección 6.2.7), por ejemplo, las moléculas con regiones Fc variantes con afinidad potenciada por FcγRIIIA tienen una actividad de ADCC potenciada. En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas que tienen una propiedad de unión alterada para un receptor de Fc activante, por ejemplo, FcγRIIIA en un ensayo *in vitro* también tienen una propiedad de unión alterada en modelos *in vivo* (tal como los descritos y dados a conocer en el presente documento). Sin embargo, la presente descripción no excluye moléculas que no presentan una unión a FcγR alterada en ensayos basados *in vitro* pero presentan el fenotipo deseado *in vivo*.

6.1.2 MUTANTES CON AFINIDAD POTENCIADA POR FcγRIIIA Y AFINIDAD REDUCIDA O NULA PARA FcγRIIB

En una realización específica, las moléculas comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones) en una o más regiones, una o más modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIIA y FcγRIIB con afinidad de tipo natural. En una realización determinada, la una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución con alanina en cualquiera de las posiciones 256, 298, 333, 334, 280, 290, 294, 298 ó 296; o una sustitución en la posición 298 con asparagina, valina, ácido aspártico, o prolina; o una sustitución 290 con serina. En determinadas realizaciones amino, la una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos 300%, al menos el 400% y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos 300%, al menos el 400%.

En una realización específica, la molécula que comprende una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y una afinidad reducida o ninguna afinidad por FcγRIIB, tal como se determina basándose en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón superficial usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante que comprende una sustitución en la posición 275 con isoleucina, en la posición 334 con asparagina, y en la posición 348 con metionina; o una sustitución en la posición 279 con leucina y en la posición 395 con serina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 319 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 255 con leucina, y en la posición 318 con lisina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 380 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 256 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 334 con ácido glutámico, y en la posición 390 con serina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina, en la posición 394 con metionina y en la posición 424 con leucina; o una sustitución en la posición 233 con ácido aspártico y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, en la posición 366 con serina y en la posición 386 con arginina; o una sustitución en la posición 312 con ácido glutámico, en la posición 327 con asparagina, y en la posición 378 con serina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina y en la posición 326 con asparagina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina; o una sustitución en la posición 298 con asparagina y en la posición 381 con arginina; o una sustitución en la posición 280 con ácido glutámico, en la posición 354 con fenilalanina, en la posición 431 con ácido aspártico, y en la posición 441 con isoleucina; o una sustitución en la posición 255 con glutamina y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 218 con arginina, en la posición 281 con ácido aspártico y en la posición 385 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 330 con treonina y en la posición 440 con glicina; o una sustitución en la posición 284 con alanina y en la posición 372 con leucina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, as posición 387 con serina y en la posición 435 con glutamina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 431 con valina y en la posición 442 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina; o una sustitución en la posición 292 con prolina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina.

En una realización específica, la molécula que comprende una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y una afinidad reducida o ninguna afinidad por FcγRIIB tal como se determina basándose en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20 que porta la región Fc variante que comprende una sustitución en la posición 379 con metionina; en la posición 219 con tirosina; en la posición 282 con metionina; en la posición 401 con valina; en la posición 222 con asparagina; en la posición 334 con isoleucina; en la posición 334 con ácido glutámico; en la posición 275 con tirosina; en la posición 398 con valina. En aún otra realización específica, la molécula que comprende una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y una afinidad reducida o ninguna afinidad por FcγRIIB tal como se determina basándose en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón superficial usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante que comprende una sustitución en la posición 243 con leucina; en la posición 292 con prolina; y en la posición 300 con leucina.

También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces menor

que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 10-15 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 10 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 7 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 5 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina. También se describe un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 2 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo natural tal como se determina mediante un ensayo ELISA, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina.

6.1.3 MUTANTES CON AFINIDAD POTENCIADA POR FcγRIIIA Y FcγRIIB

También se describen moléculas que comprenden regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y FcγRIIB en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos 300%, al menos el 400% y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos 300%, al menos el 400%. En una realización específica, la molécula descrita en el presente documento que comprende una región Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y una afinidad potenciada por FcγRIIB (tal como se determina basándose en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando anticuerpo ch-4-4-20, o un ensayo de resonancia de plasmón superficial usando un anticuerpo 4D5 quimérico, que porta la región Fc variante tal como se describe en el presente documento) comprende una sustitución en la posición 415 con isoleucina y en la posición 251 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico, en la posición 292 con leucina, y en la posición 185 con metionina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina, y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, en la posición 202 con metionina y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina, y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina, y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 343 con serina, en la posición 353 con leucina, en la

posición 375 con isoleucina, en la posición 383 con asparagina; o una sustitución en la posición 394 con metionina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 216 con ácido aspártico, en la posición 345 con lisina y en la posición 375 con isoleucina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 389
 5 con glicina; o una sustitución en la posición 222 con asparagina, en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 290 con treonina y en la posición 371 con ácido aspártico; o una sustitución en la
 10 posición 247 con leucina y en la posición 398 con glutamina; o una sustitución en la posición 326 con glutamina; en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 378 con valina, en la posición 390 con isoleucina y en la posición 422 con isoleucina; o una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico y en la posición 385 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 282 con ácido
 15 glutámico, en la posición 369 con isoleucina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 397 con metionina; en la posición 411 con alanina y en la posición 415 con asparagina; o una sustitución en la posición 223 con isoleucina, en la posición 256 con serina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 298 con asparagina y en la posición 407 con arginina; o una sustitución en la posición 246 con arginina, en la posición 298 con asparagina, y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 235 con
 20 prolina, en la posición 382 con metionina, en la posición 304 con glicina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 323 con isoleucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 313 con arginina, y en la posición 388 con glicina; o una sustitución en la posición 221 con tirosina, en la posición 252 con isoleucina, en la posición 330 con glicina, en la posición 339 con treonina, en la posición 359 con asparagina, en la posición 422 con isoleucina, y en la posición 433 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con ácido aspártico, y en la posición
 25 384 con lisina; o una sustitución en la posición 241 con leucina y en la posición 258 con glicina; o una sustitución en la posición 370 con asparagina y en la posición 440 con asparagina; o una sustitución en la posición 317 con asparagina y a delección en la posición 423; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina; o una sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 290 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 231 con valina, en la posición 386 con histidina, y en la posición
 30 412 con metionina; o una sustitución en la posición 215 con prolina, en la posición 274 con asparagina, en la posición 287 con glicina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 365 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico y en la posición 327 con treonina; o una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina; una sustitución
 35 en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con treonina, en la posición 390 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 326 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 358 con prolina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 288 con
 40 arginina, en la posición 307 con alanina, en la posición 344 con ácido glutámico, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con isoleucina, en la posición 326 con ácido glutámico, en la posición 328 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 326 con isoleucina, en la posición 408 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 379 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una
 45 sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 261 con asparagina, en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 419 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 242 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 255
 50 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 250 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 419 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 427 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con
 55 ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 323 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 305 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 400 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 303 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición
 60 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con ácido glutámico, en la posición 369 con alanina, en la posición 393 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con asparagina, en la posición 222 con isoleucina, en la posición 320 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 309 con leucina, en la
 65 posición 390 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con asparagina; en la posición 419 con arginina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con alanina, en la

posición 359 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 215 con isoleucina, en la posición 290 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 275 con leucina, en la posición 362 con histidina, en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 400 con prolina; o una sustitución en la posición 407 con isoleucina; o una sustitución en la posición 372 con tirosina; o una sustitución en la posición 366 con asparagina; o una sustitución en la posición 414 con asparagina; o una sustitución en la posición 352 con leucina; o una sustitución en la posición 225 con serina; o una sustitución en la posición 377 con asparagina; o una sustitución en la posición 248 con metionina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o en la posición 292 con prolina, y en la posición 305 con isoleucina.

6.1.4 MUTANTES QUE NO SE UNEN A NINGÚN FcγR

También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, región Fc variante que no se une a ningún FcγR, tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer en el presente documento, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo natural. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que suprimen la unión a todos los FcγR comprenden una sustitución en la posición 232 con serina y en la posición 304 con glicina; o una sustitución en la posición 269 con lisina, en la posición 290 con asparagina, en la posición 311 con arginina, y en la posición 433 con tirosina; o una sustitución en la posición 252 con leucina; o una sustitución en la posición 216 con ácido aspártico, en la posición 334 con arginina, y en la posición 375 con isoleucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 406 con fenilalanina, o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 387 con serina, y en la posición 435 con glutamina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 380 con ácido aspártico, y en la posición 446 con valina; o una sustitución en la posición 303 con isoleucina, en la posición 369 con fenilalanina, y en la posición 428 con leucina; o una sustitución en la posición 251 con fenilalanina y en la posición 372 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con ácido glutámico, en la posición 284 con metionina y en la posición 308 con alanina; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico y en la posición 402 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico y en la posición 428 con leucina.

6.1.5 MUTANTES CON FUNCIONES EFECTORAS MEDIADA POR FcγR ALTERADAS

También se describe una inmunoglobulina que comprende variantes de Fc con funciones efectoras alteradas. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes de Fc median una función efectora más eficazmente en presencia de células efectoras tal como se determina usando ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden variantes de Fc median una función efectora menos eficazmente en presencia de células efectoras tal como se determina usando ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento. En realizaciones específicas, las variantes de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc conocidas que alteran la función efectora, de modo que la combinación tiene un efecto aditivo y sinérgico. Las variantes de Fc tienen una función efectora alterada *in vitro* y/o *in vivo*.

En una realización específica, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen una función efectora mediada por FcγR potenciada tal como se determina usando ensayos de actividad de ADCC dados a conocer en el presente documento. Los ejemplos de funciones efectoras que podrían mediar por las moléculas incluyen, pero no se limitan a, unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, etc. Las funciones efectoras de las moléculas pueden someterse a ensayo usando métodos convencionales conocidos en la técnica, ejemplos que se dan a conocer en la sección 6.2.6.

En una realización específica, las inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA median citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) 2 veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA median citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10^4 veces, al menos 10^5 veces más eficazmente, que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural. En otra realización específica, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen actividad de unión a C1q alterada. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10^4 veces, al menos 10^5 veces actividad de unión a C1q mayor que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural. En aún otra realización específica, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por

Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen citotoxicidad alterada dependiente del complemento. En aún otra realización específica, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen una citotoxicidad potenciada dependiente del complemento que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces citotoxicidad dependiente del complemento mayor que una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural.

En determinadas realizaciones, las variantes de Fc pueden combinarse con o comprender cualquiera de las variantes de Fc identificadas previamente por los inventores para modular la función efectora tal como se da a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. Se proporcionan ejemplos de tales variantes de Fc identificadas previamente por los autores en las tablas 6 y 7 a continuación.

En otras realizaciones, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen actividad de fagocitosis potenciada en relación con una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural, tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos por un experto en la técnica o tal como se da a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas con afinidad potenciada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces actividad de fagocitosis mayor en relación con una inmunoglobulina que comprende una región Fc de tipo natural.

Tabla 6						
Resumen de la actividad de ADCC de mutantes en ch4D5						
Etiqueta	Variante de Fc		ADCC			
	Ref	Variación de aminoácido	1 μ g/ml		0,5 μ g/ml	
			% de lisis específica	Normalizado	% de lisis específica	Normalizado
MGFc-27	2C4	G316D, A378V, D399E	33%	2,24	22%	3,60
MGFc-31	3B9	P247L, N421K	30%	2,05	17%	2,90
MGFc-10	1E1	K288N, A330S, P396L	24%	1,66	10%	1,67
MGFc-28	2C5	N315I, V379M, T394M	20%	1,37	10%	1,69
MGFc-29	3D11	F243I, V379L, G420V	20%	1,35	7%	1,17
CH4-4-20 (P54008)			15%	1,00	6	1,00
MGFc-35	3D2	R255Q, K326E	11%	0,79	3%	0,53
MGFc-36	3D3	K218R, G281D, G385R	10%	0,67	5%	0,78
MGFc-30	3A8	F275Y	9%	0,64	2%	0,37
MGFc-32	3C8	D280E, S354F, A431D, L441I	9%	0,62	4%	0,75
MGFc-33	3C9	K317N, F423 Δ	3%	0,18	-1%	-0,22
MGFc-34	3B10	F421L, E258G	-1%	-0,08	-4%	-0,71
MGFc-26		D265A	1%	0,08	-3%	-0,45

6.2

Tabla 7: Resumen de mutantes

Variante de Fc	Cambios de aminoácido	FcR3A, KD/K _{dis}	FcR2B, KD/K _{dis}	Unión a IIIA ELISA	Unión a IIB ELISA	Fagocitosis (mutante/WT)	4-4-20 ADCC (mutante/wt)	Anti-HER2 ADCC (mutante/wt)
De tipo natural	ninguno	198/0,170	94/0,094	1	1	1	1	1
MGFc 5	V379M	160/0,167	70/0,10	2X	N/C	0,86	2,09	1,77
MGFc 9	P2431, V379L	99,7/0,105	120/0,113	1,5X	reducida	?	2,25	2,04
MGFc 10	K288N, A330S, P396L	128/0,115	33,4/0,050	5X	3X	1,2	2,96	2,50
MGFc 11	F243L, R255L	90/0,075	74,7/0,09	1x	reducida	0,8	2,38	1,00
MGFc 13	K334E, T359N, T366S	55,20,128	72/0,11	1,5X	N/C	[	1,57	3,67
MGFc 14	K288M, K334E	75,4/0,1	95,6/0,089	3X	reducida	[	1,74	
MGFc 23	K334E, R292L	70,2/0,105	108/0,107			[	2,09	1,6
MGFc 27	3316D, A378V, D399E	72/0,117	46/0,06	1,5X	14X	1,4	3,60	6,88
MGFc 28	N315I, A379M, D399E			1X	9X	1,37	1,69	1,00
MGFc 29	P2431, V379L, G420V	108/0,082	93,4/.101	2,5X	7X	0,93	1,17	1,00
MGFc 31	P247L, N421K	62/0,108	66/0,065	3X	N/C	1,35	2,90	1,00
MGFc 37	K248M	154/0,175	100/0,091	1,4X	reducida	0,98	3,83	0,67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0,104	50/0,041	4,5X	2,5X	1,4	3,07	2,50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0,198	86/0,074	1,4X	reducida	1,5	4,29	0,50
MGFc 40	K248M	180/0,186	110/0,09	1,4X	reducida	1,14	4,03	
MGFc 41	H268N, P396L	178/0,159	46,6/0,036	2,2X	4,5X	1,96	2,24	0,67
MGFc 43	Y319F, P352L, P396L	125/0,139	55,7/0,041	3,5X	2X	1,58	1,09	

También se describe una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante con una o más modificaciones de aminoácidos, con una afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA de modo que la inmunoglobulina tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o fagocitosis. En una realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y aumentan la actividad de ADCC de la inmunoglobulina comprenden una sustitución en la posición 379 con metionina; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 leucina y en la posición 255 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 292 con leucina; o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina, y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina; o una sustitución en la posición 248 con metionina; o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico, y en la posición 327 con treonina; o una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina.

En otra realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la actividad de ADCC de la inmunoglobulina es cualquiera de las mutaciones indicadas a continuación, en la tabla 8.

TABLA 8. MODIFICACIONES DE AMINOÁCIDOS QUE AUMENTAN ADCC

E333A, K334A	T250S, P396L
R292L, K334E	P247S, P396L
V379M	K290E, V369A, T393A, P396L
S219Y	K210N, K222I, K320M, P396L
V282M	L410H, P396L
K222N	Q419L, P396L
F243I, V379L	V427A, P396L
F243L, R255L, E318K	P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
K334I	E258D, P396L
K334E, T359N, T366S	N384K, P396L
K288M, K334E	V323I, P396L
K288N, A330S, P396L	K246N, Q419R, P396L
K326E	V273I, K326E, L328I, P396L
G316D, A378V, D399E	K326I, S408N, P396L
N315I, V379M, T394M	K334N, P396L
F243I, V379L, G420V	V379M, P396L
E293V, Q295E, A327T	P227S, P396L
Y319F, P352L, P396L	P217S, P396L
K392T, P396L	K261N, K210M, P396L
K248M	Q419H, P396L
H268N, P396L	K370E, P396L
K290T, N390I, P396L	L242F, P396L

K326I, P396L	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
H268D, P396L	R255L, P396L
K210M, P396L	V240A, P396L
L358P, P396L	P217A, T359A, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L	P244H, P396L
D270E, G316D, R416G	V215I, K290V, P396L
P247L, N421K	F275L, Q362H, N384K, P396L
P247L, N421K, D270E	V305L, P396L
Q419H, P396L, D270E	S400F, P396L
K370E, P396L, D270E	V303I, P396L
R255L, P396L, D270E	F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L
V240A, P396L, D270E	F243L, R292P, Y300L, P396L
K392T, P396L, D270E	F243L, R292P, Y300L

Alternativa o adicionalmente, puede ser útil combinar las modificaciones de aminoácidos anteriores o cualquier otra modificación de aminoácidos dada a conocer en el presente documento con una o más modificaciones adicionales de aminoácidos que alteren la unión a C1q y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento de la región Fc. La molécula de partida de particular interés en el presente documento es habitualmente una que se une a C1q y presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácido adicionales descritas en el presente documento servirán generalmente para alterar la capacidad de la molécula de partida para unirse a C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, reducir y preferiblemente suprimir estas funciones efectoras. Sin embargo, moléculas que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con unión a C1q mejorada y/o función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, la molécula de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar en CDC y puede modificarse según las enseñanzas en el presente documento de modo que adquiere estas funciones efectoras adicionales. Además, moléculas con actividad de unión a C1q preexistente, que tienen además opcionalmente la capacidad de mediar en CDC, pueden modificarse de modo que se potencian una o ambas de estas actividades.

Tal como se dio a conocer anteriormente, puede diseñarse una región Fc con función efectora alterada, por ejemplo, modificando la unión a C1q y/o unión a FcR y cambiando de ese modo la actividad de CDC y/o actividad de ADCC. Por ejemplo, puede generarse una región Fc variante con unión a C1q mejorada y unión a FcγRIII mejorada; por ejemplo, que tienen ambas actividad de ADCC mejorada y actividad de CDC mejorada. Alternativamente, cuando se desea que la función efectora se reduzca o suprima, puede modificarse por ingeniería genética una región Fc variante con actividad de CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras realizaciones, puede aumentarse sólo una de estas actividades, y opcionalmente también reducirse la otra actividad, por ejemplo, para generar una variante de región Fc con actividad de ADCC mejorada, pero actividad de CDC reducida y viceversa.

También se describen variantes específicas de la región Fc que se han identificado usando los métodos en el presente documento de una biblioteca de levaduras de mutantes después de la 2^a-4^a tanda de clasificación y se enumeran en la tabla 9. La tabla 9 resume los diversos mutantes que se identificaron usando los métodos en el presente documento. Se sometieron a ensayo los mutantes usando un ensayo ELISA para determinar la unión a FcγRIIIA y FcγRIIB. También se sometieron a prueba los mutantes en un ensayo de ADCC, clonando las variantes de Fc en un anticuerpo ch 4-4-20 usando métodos dados a conocer y ejemplificados en el presente documento. Los elementos en negrita se refieren a experimentos en los que se purificaron los ch4-4-20 antes del ensayo de ADCC. La concentración de anticuerpo usada estaba en el intervalo de 0,5 µg/ml - 1,0 µg/ml.

TABLA 9: MUTACIONES IDENTIFICADAS EN LA REGIÓN Fc				
Mutaciones	Dominio	Unión a FcγRIIIA (ELISA)	Unión a FcγRIIB (ELISA)	ADCC de 4-4-20 (Lisis relativa (Mut/Wt))
Examen con FACS de la biblioteca pYD-CH1 con tetrámero A				
Q347H; A339V	CH3	↑ = 0,5x	NT	

ES 2 672 121 T3

S415I; L251F	CH2,CH3	↑ = 0,5x	↑ 0,75x	0,82
K392R	CH3	N/C	NT	
D399E; R292L; V185M	CH1,CH2,CH3	N/C	↑0,5x	0,65 0,9
K290E; L142P	CH1, CH2	N/C	NT	
R301C; M252L; S192T	CH1,CH2	↓ 0,5x	NT	
P291S; K288E; H268L: A141V	CH1,CH2	↓ 0,5x	NT	
N315I	CH2	N/C	↑ 0,75x	
S132I	CH1	N/C =	NT	
S383N; N384K; T256N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M	Todos	↑0,5x	NT	
S408I; V215I; V125L	CH1,CH2,CH3	↑0,5x	↑ 0,75x	0,62
P396L	CH3	↑1x	↑1x	0,55
G385E; P247H;	CH2, CH3	↑1x	↑ 0,75x	0,44
P396H	CH3	↑1x	□↑1x	0,58
A162V	CH1	N/C	NT	
V348M; K334N; F275I; Y202M; K147T	CH1,CH2,CH3	↑0,5x	↑ 0,75x	0,33
H310Y; T289A; G337E	CH2	↑ 0,5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D	CH1,CH2,CH3	N/C	N/C	0,29
K409R; S166N	CH1, CH3	N/C	NT	
Mutantes dirigidos al sitio <i>in vitro</i>				
R292L	CH2	NT	NT	0,82
T359N	CH3	NT	NT	1,06
T366S	CH3	NT	NT	0,93
E333A, K334A	CH2	NT	NT	1,41
R292L, K334E	CH2	NT	NT	1,41; 1,64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3	NT	NT	0,89; 1,15
V379L	CH3	NT	NT	0,83
K288N	CH2	NT	NT	0,78
A330S	CH2	NT	NT	0,52
F243L	CH2	NT	NT	0,38
E318K	CH2	NT	NT	0,86
K288N, A330S	CH2	NT	NT	0,08
R255L, E318K	CH2	NT	NT	0,82
F243L, E318K	CH2	NT	NT	0,07
Mutantes en la minibiblioteca de 4-4-20 aumentaron la unión a FcγRIIIA, disminuyeron o no cambiaron la unión a FcγRIIB N/C significa sin cambio; N/B significa sin unión; NT significa no sometido a prueba				
V379M	CH3	↑2x	N/C	1,47
S219Y	Bisagra	↑1x	↓ o N/B	1,28
V282M	CH2	↑1x	↓ o N/B	1,25; 1

ES 2 672 121 T3

F275I, K334N,V348M	CH2	↑0,5x	N/C	
D401V	CH3	↑0,5x	N/C	
V279L,P395S	CH2	↑ 1x	N/C	
K222N	Bisagra	↑1x	↓ o N/B	1,33; 0,63
K246T,Y319F	CH2	↑ 1x	N/C	
F243I,V379L	CH2,CH3	↑1,5x	↓ o N/B	1,86; 1,35
F243L,R255L,E318K	CH2	↑1x	↓ o N/B	1,81; 1,45
K334I	CH2	↑ 1x	N/C	2,1; 1,97
K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑1,5x	N/C	1,49; 1,45
K288M, K334E	CH2	↑ 3x	↓ o N/B	1,61; 1,69
K334E,E380D	CH2,CH3	↑1,5x	N/C	
T256S,V305I, K334E,N390S	CH2,CH3	↑1,5x	N/C	
K334E	CH2	↑2,5x	N/C	1,75; 2,18
T335N,K370E,A378V,T394M,S424L	CH2,CH3	↑0,5x	N/C	
E233D,K334E	CH2	↑1,5x	N/C	0,94; 1,02
K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	↑ 1x	N/C	
Unión aumentada a FcγIIIA y FcγRIIB				
K246T,P396H	CH2,CH3	↑ 1x	↑2,5x	
H268D,E318D	CH2	↑1,5x	↑ 5x	
K288N, A330S,P396L	CH2,CH3	↑ 5x	↑ 3x	2,34; 1,66; 2,54
I377F	CH3	↑1,5x	↑0,5x	
P244H,L358M, V379M,N384K,V397M	CH2,CH3	↑1,75x	↑1,5x	
P217S, A378V,S408R	Bisagra,CH3	↑ 2x	↑4,5x	
P247L, I253N, K334N	CH2	↑ 3x	↑2,5x	
P247L	CH2	↑0,5x	↑ 4x	0,91; 0,84
F372Y	CH3	↑0,75x	↑5,5x	0,88; 0,59
K326E	CH2	↑ 2x	↑3,5x	1,63; 2
K246I, K334N	CH2	↑0,5x	↑ 4x	0,66; 0,6
K320E,K326E	CH2	↑ 1x	↑ 1x	
H224L	Bisagra	↑0,5x	↑ 5x	0,55; 0,53
S375C,P396L	CH3	↑1,5x	↑4,5x	
D312E,K327N,I378S	CH2,CH3	↑0,5x	N/C	
K288N, K326N	CH2	↑ 1x	N/C	
F275Y	CH2	↑ 3x	N/C	0,64
P247L,N421K	CH2,CH3	↑ 3x	N/C	2,0
S298N,W381R	CH2,CH3	↑ 2x	N/C	
D280E,S354F,A431D,L4411	CH2,CH3	↑ 3x	N/C	0,62
R255Q,K326E	CH2	↑ 2x	N/C	0,79
K218R,G281D,G385R	H,CH2,CH3	T3,5x	N/C	0,67

ES 2 672 121 T3

L398V	CH3	↑1,5x	N/C	
P247L,A330T,S440G	CH2,CH3	↑0,75x	↓0,25x	
V284A,F372L	CH2,CH3	1x	N/C	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	1,25x	N/C	
P247L,A431 V,S442F	CH2,CH3	1x	N/C	
Unión aumentada a FcγRIIIA y FcγRIIB				
P343S,P353L,S375I,S383N	CH3	↑0,5x	↑ 6x	
T394M,V397M	CH3	↑0,5x	↑ 3x	
E216D,E345K,S375I	H, CH2,CH3	↑ 0,5x	↑ 4x	
K334N,	CH2	↑0,5x	↑ 2x	
K288N,A330S,P396L	CH2,CH3	↑0,5x	↑ 9x	
P247L,E389G	CH2,CH3	↑1,5x	↑ 9x	
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M	H, CH2,CH3	↑ 1x	↑ 7x	
G316D,A378V,D399E	CH2,CH3	↑1,5x	↑ 14x	2,24
N315I,V379M,T394M	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 9x	1,37
K290T,G371D,	CH2,CH3	↑0,25x	↑ 6x	
P247L,L398Q	CH2,CH3	↑1,25x	↑ 10x	
K326Q,K334E,T359N,T366S	CH2,CH3	↑ 1,5x	↑ 5x	
S400P	CH3	↑ 1x	↑ 6x	
P247L,I377F	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 5x	
A378V,N390I,V422I	CH3	↑ 0,5x	↑ 5x	
K326E,G385E	CH2,CH3	↑0,5x	↑ 15x	
V282E,V369I,L406F	CH2,CH3	↑ 0,5x	↑ 7x	
V397M,T411A,S415N	CH3	↑ 0,25x	↑5x	
T223I,T256S,L406F	H, CH2,CH3	↑0,25x	↑ 6x	
S298N,S407R	CH2,CH3	↑0,5x	↑ 7x	
K246R,S298N,I377F	CH2,CH3	↑ 1x	↑ 5x	
S407I	CH3	↑ 0,5x	↑4x	
F372Y	CH3	↑0,5x	↑4x	
L235P,V382M,S304G,V305I,V323I	CH2,CH3	↑ 2x	↑ 2x	
P247L,W313R,E388G	CH2,CH3	↑1,5x	↑1x	
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L	H, CH2,CH3	↑2,5x	↑ 6x	
E258D,N384K	CH2,CH3	↑1,25x	↑4x	
F241L,E258G	CH2	↑ 2x	↑ 2,5x	-0,08
K370N,S440N	CH3	↑1x	↑3,5x	
K317N,F423 deleccionado	CH2,CH3	↑2,5x	↑ 7x	0,18
F243I,V379L,G420V	CH2,CH3	↑2,5x	↑3,5x	1,35
P227S,K290E	H, CH2	↑ 1x	↑0,5x	
A231V,Q386H,V412M	CH2,CH3	↑1,5x	↑ 6x	
T215P,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑ 4x	

ES 2 672 121 T3

Unión aumentada a FcγRIIB pero no a FcγRIIIA				
K334E,E380D	CH2,CH3	N/C	↑4,5x	
T366N	CH3	N/C	↑ 5x	
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T	CH2,CH3	N/C	↑ 3x	
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V	H, CH2,CH3	↓ 0,25x	↑10x	
Unión disminuida a FcγRIIIA y FcγRIIB				
R301H, K340E,D399E	CH2,CH3	↓ 0,50x	↓0,25x	
K414N	CH3	↓ 0,25x	N/B	
P291S,P353Q	CH2,CH3	↓ 0,50x	↓0,25x	
V240I, V281M	CH2	↓ 0,25x	↓0,25x	
P232S, S304G	CH2	N/B	N/B	
E269K,K290N,Q311R,H433Y	CH2,CH3	N/B	N/B	
M352L	CH3	N/B	N/B	
E216D,K334R,S375I	H, CH2,CH3	N/B	N/B	
P247L,L406F	CH2,CH3	N/B	N/B	
T335N,P387S,H435Q	CH2,CH3	N/B	N/B	
T225S	CH2	↓ 0,25x	↓ 0,50x	
D399E,M428L	CH3	↓ 0,50x	↓ 0,50x	
K246I,Q362H,K370E	CH2,CH3	N/B	↓ 0,50x	
K334E,E380D,G446V	CH2,CH3	N/B	N/B	
I377N	CH3	↓ 0,50x	N/B	
V303I,V369F,M428L	CH2,CH3	N/B	N/B	
L251F,F372L	CH2,CH3	N/B	N/B	
K246E,V284M,V308A	CH2,CH3	N/B	N/B	
D399E,G402D	CH3	N/B	N/B	
D399E,M428L	CH3	N/B	N/B	
Depleción de FcγRIIB/selección de FcγRIIIA: Biblioteca de Fc sin tratamiento previo.				
E293V,Q295E,A327T	CH2	↑0,4x	↓ o N/B	4,29
Y319F,P352L,P396L	CH2,CH3	↑3,4x	↑2x	1,09
K392T,P396L	CH3	↑4,5x	↑2,5x	3,07
K248M	CH2	↑0,4x	↓ o N/B	4,03
H268N,P396L	CH2,CH3	↑2,2x	↑4,5x	2,24
Competencia en disolución 40X FcγRIIB-G2: biblioteca de P396L				
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D		↑3,6x	↑0,1x	3,17
Examen en equilibrio: monómero de FcγRIIIA 0,8 μM: biblioteca de P396L				
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	□↑2,8x	↑6,1x	1,93
K326I, P396L	CH2, CH3	□↑2,9x	↑5,9x	1,16

ES 2 672 121 T3

H268D, P396L	CH2, CH3	↑3,8x	↑3,7x	2,15
K210M, P396L	CH1,CH3	↑1,9x	↑4,6x	2,02
L358P, P396L	CH3	↑1,9x	↑4,2x	1,58
K288R, T307A, K344E,P396L	CH2, CH3	↑ 4,1x	↑ 2,3x	3,3
V273I, K326E, L328I, P396L	CH2, CH3	↑1,3x	↑10,8x	0,78
K326I, S408N, P396L	CH2, CH3	↑4x	↑ 9,3x	1,65
K334N, P396L	CH2, CH3	↑3,1x	↑ 3x	2,43
V379M, P396L	CH3	↑1,9x	↑5,6x	2,01
P227S, P396L	CH2, CH3	↑1,5x	↑ 4x	2,01
P217S, P396L	H, CH3	↑1,6x	↑4,5x	2,04
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	↑ 2x	↑4,2x	2,06
Examen cinético: 0,8 μM, 1' con FcγRIIIA 8 μM frío: biblioteca de P396L				
El término es M, P396L	CH3	↑1,9x	↑ 7,2x	3,09
Q419H, P396L	CH3	↑ 2x	↑ 6,9x	2,24
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑6,6x	2,47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 4,1x	2,4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	↑1,6x	↑5,4x	3,59
R255L, P396L	CH2, CH3	↑1,8x	↑ 6x	2,79
V240A, P396L	CH2, CH3	↑1,3x	↑4,2x	2,35
T250S, P396L	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑6,8x	1,60
P247S, P396L	CH2,CH3	↑ 1,2x	↑4,2x	2,10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2,CH3	↑1,3x	↑6,7x	1,55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2,CH3	↑ 2,7x	↑8,7x	1,88
L410H, P396L	CH3	↑ 1,7x	↑ 4,5x	2,00
Q419L,P396L	CH3	↑ 2,2x	↑ 6,1x	1,70
V427A, P396L	CH3	↑ 1,9x	↑4,7x	1,67
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2,CH3	↑2x	↑ 7x	1,54
E258D, P396L	CH2,CH3	↑ 1,9x	↑ 4,9x	1,54
N384K, P396L	CH3	↑ 2,2x	↑5,2x	1,49
V323I, P396L	CH2,CH3	↑ 1,1x	↑ 8,2x	1,29
K246N, Q419R, P396L	CH2,CH3	↑1,1x	↑ 4,8x	1,10
P217A, T359A, P396L	H,CH2,CH3	↑1,5x	↑ 4,8x	1,17
P244H, P396L	CH2,CH3	↑2,5x	↑ 4x	1,40
V215I, K290V, P396L	H,CH2,CH3	↑2,2x	↑ 4,6x	1,74
F275L, Q362H, N384K, P396L	CH2,CH3	↑ 2,2x	↑ 3,7x	1,51
V305L, P396L	CH2,CH3	↑1,3x	↑ 5,5x	1,50
S400F, P396L	CH3	↑1,5x	↑4,7x	1,19
V303I, P396L	CH3	↑1,1x	↑ 4x	1,01
Depleción de FcγRIIB/selección en fase sólida de FcγRIIIA 158V: biblioteca sin tratamiento previo				

A330V, H433Q, V427M	CH2,CH3	NT	NT	NT
V263Q, E272D, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
N276Y, T393N, W417R	CH2,CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H	CH2,CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W	CH2,CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R	CH2,CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R	CH2,CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N	CH2	NT	NT	NT
V263Q, E272D	CH2	NT	NT	NT
R292G	CH2	NT	NT	NT
S298N	CH2	NT	NT	NT
E233G, P247S, L306P	CH2	NT	NT	NT
D270E	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T	CH2	NT	NT	NT
E233G	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L	CH2,CH3	NT	NT	NT
Depleción de FcγRIIB/ selección en fase sólida de FcγRIIA 158F: biblioteca sin tratamiento previo				
158F mediante FACS, parte superior, 0,2%				
V284M, S298N, K334E, R355W R416T	CH2,CH3	NT	NT	
Depleción de FcγRIIB/ selección en fase sólida de FcγRIIA 131H: biblioteca sin tratamiento previo				
R292P, V305I	CH2,CH2	NT	NT	
D270E, G316D, R416G	CH2,CH3	NT	NT	
V284M, R292L, K370N	CH2,CH3	NT	NT	
R292P, V305I, F243L	CH2	NT	NT	

- También se describen moléculas de inmunoglobulina modificadas (por ejemplo, anticuerpos) con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la molécula por FcγRIIA y/o FcγRIIB. Tales inmunoglobulinas incluyen moléculas de IgG que contienen de manera natural regiones de unión a FcγR (por ejemplo, región de unión a FcγRIIA y/o FcγRIIB), o derivados de inmunoglobulina que se han modificado por ingeniería genética para contener una región de unión a FcγR (por ejemplo, región de unión a FcγRIIA y/o FcγRIIB). Las inmunoglobulinas modificadas incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une, preferiblemente, de manera inmuno-específica, es decir, elimina por competencia la unión no específica tal como se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para someter a ensayo la unión específica antígeno-anticuerpo, a un antígeno y contiene una región de unión a FcγR (por ejemplo, una región de unión a FcγRIIA y/o FcγRIIB). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multispecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos por disulfuro y fragmentos que contienen o bien un dominio VL o bien uno VH o incluso una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en determinados casos, se modifica por ingeniería genética para contener o se fusiona a una región de unión a FcγR.

- En algunas realizaciones, las moléculas comprenden porciones de una región Fc. Tal como se usa en el presente documento el término "porción de una región Fc" se refiere a fragmentos de la región Fc, preferiblemente una porción con actividad efectora y/o actividad de unión a FcγR (o una región comparable de un mutante que carece de

tal actividad). El fragmento de una región Fc puede oscilar en tamaño entre 5 aminoácidos y toda la región Fc menos un aminoácido. La porción de una región Fc puede faltar hasta en 10, hasta en 20, hasta en 30 aminoácidos desde el extremo N-terminal o el extremo C-terminal.

- 5 Las moléculas de IgG son preferiblemente la subclase IgG1 de IgG, pero también pueden ser cualquier otra subclase de IgG de animales dados. Por ejemplo, en seres humanos, la clase de IgG incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgG de ratón incluye IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

- 10 Las inmunoglobulinas (y otros polipéptidos usados en el presente documento) pueden proceder de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, de roedor (por ejemplo, ratón y rata), asno, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo. Tal como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe a
15 continuación y, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.939.598 de Kucherlapati *et al.*

- Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido o pueden ser
20 específicos para epítopos heterólogos, tales como un polipéptido o material de soporte sólido heterólogo. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J. Immunol., 147:60-69, 1991; las patentes estadounidenses n.ºs 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148:1547-1553, 1992.

- 25 Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque tales moléculas normalmente sólo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, AcBs), se describen anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos. Los ejemplos de AcBs incluyen sin limitación aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula citotóxica.

- 30 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de cadena completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983). Dada la distribución al azar de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la
35 estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

- 40 Según un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión específicas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadenas ligeras, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan
45 ADN que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión independientes, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que razones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos ópticos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las
50 tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en razones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las razones no tienen una significación particular.

- En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena
55 ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina sólo en la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se da a conocer en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por
60 ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986). Según otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, un par de moléculas de anticuerpo pueden modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácido de pequeño tamaño de la superficie de contacto de la
65 primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales de mayor tamaño (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la superficie de

contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido de gran tamaño por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

- 5 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que tales anticuerpos direccionan células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente estadounidense n.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Pueden producirse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

- 15 Los anticuerpos incluyen derivados que se modifican de otro modo, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una a antígeno y/o genere una respuesta anti-idiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

- 25 Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede preferirse usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante derivada de una inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science, 229:1202, 1985; Oi *et al.*, BioTechniques, 4:214 1986; Gillies *et al.*, J. Immunol. Methods, 125:191-202, 1989; las patentes estadounidenses n.ºs 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones de entramado y dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, se sustituirán residuos de región de entramado en las regiones de entramado humanas por el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de región de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de región de entramado y CDR para identificar residuos de región de entramado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos inusuales de región de entramado en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature, 332:323, 1988. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o remodelado de la superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498, 1991; Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7(6):805-814, 1994; Roguska *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973, 1994), e intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332). Pueden generarse anticuerpos humanizados usando cualquiera de los métodos dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.693.762 (Protein Design Labs), 5.693.761, (Protein Design Labs) 5.585.089 (Protein Design Labs), 6.180.370 (Protein Design Labs) y las publicaciones estadounidenses n.ºs 20040049014, 200300229208.

- Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo los métodos de presentación en fago descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

- También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol., 13:65-93, 1995. Para un comentario detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes estadounidenses n.ºs 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, pueden solicitarse los servicios de empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont,

CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers *et al.*, Bio/technology, 12:899-903, 1988).

También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc, mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos un residuo de aminoácido, aumentando la modificación la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc, mediante modificación de al menos un residuo de aminoácido, aumentando la modificación la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y disminuyendo adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Los anticuerpos terapéuticos modificados por ingeniería genética pueden tener además una función efectora potenciada, por ejemplo, actividad de ADCC potenciada, actividad de fagocitosis, etc., tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado monoclonal específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, anticuerpo Ab4D5 humanizado tal como se da a conocer en Carter *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9) mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal frente a Her2/neu humanizado también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, los anticuerpos monoclonales humanizados modificados por ingeniería genética específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico de ratón y ser humano, 2H7 mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-CD20 monoclonal, 2H7 también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado por ingeniería genética, 2H7 puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD79a, CD79b, CD103, CTLA4, ErbB1, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF-α, receptor de TNF-β o receptor de TNF-γ (particularmente una forma humanizada o quimerizada del anticuerpo) mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD79a, CD79b, CD103, CTLA4, ErbB1, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF-α, receptor de TNF-β o receptor de TNF-γ también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo que se une a A33, CD5, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD79a, CD79b, CD103, CTLA4, ErbB1, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF-α, receptor de TNF-β o receptor de TNF-γ puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo (o versiones quiméricas, humanizadas u otras modificadas por ingeniería genética del mismo), que comprende el dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.4.3, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente (depositados ante la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende los dominios variables de cadena pesada y/o de cadena ligera de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB que comprende el dominio variable de cadena pesada que

tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado que comprende el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB incluyendo pero sin limitarse a cualquiera de los anticuerpos dados a conocer en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/403.266 presentada el 12 de agosto de 2002, la solicitud estadounidense n.º 10/643.857 presentada el 14 de agosto de 2003, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/562.804 presentada el 16 de abril de 2004, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/582.044 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/582.045 presentada el 21 de junio de 2004, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/636.663 presentada el 15 de diciembre de 2004 y la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/524.134 presentada el 11 de febrero de 2005 mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado incluyendo pero sin limitarse a cualquiera de los anticuerpos dados a conocer en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/569.882 presentada el 10 de mayo de 2004, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/582.043 presentada el 21 de junio de 2004 y solicitud estadounidense n.º 11/126.978, presentada el 10 de mayo de 2005 mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB, que pueden humanizarse o no, que pueden modificarse por ingeniería genética según los métodos en el presente documento son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene el número de registro ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene el número de registro ATCC PTA-4592, el anticuerpo monoclonal 1D5 que tiene el número de registro ATCC PTA-5958, el anticuerpo monoclonal 1F2 que tiene el número de registro ATCC PTA-5959, el anticuerpo monoclonal 2D11 que tiene el número de registro ATCC PTA-5960, el anticuerpo monoclonal 2E1 que tiene el número de registro ATCC PTA-5961, 8B5.3.4 que tiene el número de registro ATCC PTA-7610, y el anticuerpo monoclonal 2H9 que tiene el número de registro ATCC PTA-5962 (todos depositados en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB según métodos en el presente documento que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente las 6 CDR, del anticuerpo producido por los clones 2B6, 3H7 o 8B5.3.4 con los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592 y PTA-7610, respectivamente (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). En una realización específica, un anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según métodos en el presente documento comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente las 6 CDR, del anticuerpo producido por los clones 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). En otra realización, un anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según métodos en el presente documento se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir de los clones 2B6, 3H7 o 8B5.3.4 con los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592 y PTA-7610, respectivamente y/o compite con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir de los clones 2B6, 3H7 o 8B5.3.4 con los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592 y PTA-7610, respectivamente tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una afinidad mayor que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se une a FcγRIIA. En otra realización, un anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según métodos en el presente documento se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir de los clones 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, y/o compite con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir de los clones 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB, mediante su región variable, con una afinidad mayor que aquella con la que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se une a FcγRIIA.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera que es idéntica en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen

los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es idéntica en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluyendo búsquedas de proteína de tipo BLAST.

También se describe la modificación por ingeniería genética de uno o más anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden uno o más dominios variables codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de uno o más dominios variables de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, en condiciones rigurosas. También se describe la modificación por ingeniería genética de uno o más anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden un dominio variable de cadena ligera y/o variable de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos del dominio variable de cadena ligera y/o variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, en condiciones rigurosas. También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos anti-FcγRIIB que comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tiene los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, hibridación con ADN unido al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45°C seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X/SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65°C, condiciones altamente rigurosas tales como hibridación con ADN unido al filtro en SSC 6X a aproximadamente 45°C seguido por uno o más lavados en SSC 0,1X/SDS al 0,2% a aproximadamente 60°C, o cualesquiera otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. 1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden humanizarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento y/o comprender las regiones CDR de un anticuerpo específico para FcγRIIB humanizado o anticuerpo específico para CD20 humanizado, en los que dichas CDR se derivan de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB o CD20, respectivamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento comprenden alteraciones, incluyendo pero sin limitarse a delecciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, del anticuerpo aceptor, es decir, regiones de entramado de dominio variable de cadena ligera y/o pesada humanas que son necesarias para retener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región de entramado de una región variable de anticuerpo humano que se produce de manera natural, sino que contienen diversas alteraciones, incluyendo pero sin limitarse a delecciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región variable de anticuerpo humanizado específico para la misma diana que el anticuerpo específico para FcγRIIB o CD20 murino. En la mayoría de las realizaciones preferidas, se realizan un número mínimo de alteraciones a la región de entramado para evitar introducciones a gran escala de residuos no humanos de región de entramado y para garantizar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en seres humanos. El anticuerpo monoclonal donador es preferiblemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 (que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente) que se unen a FcγRIIB, o el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo para CD20, tal como rituximab o 2H7.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo con CDR injertada que comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende residuos de región de entramado del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 que tienen los números de registro ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-7610, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo con CDR injertada que comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende residuos de región de entramado del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 8B5.3.4, 1D5, 2E1, 2H9,

2D11 o 1F2.

Preferiblemente, los anticuerpos humanizados para FcγRIIB se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. Los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de las combinaciones pueden tener una región variable de

5 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22) y/o una CDR2 (SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28).

10 También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado con el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

15 También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado, en la que la región VH del anticuerpo para FcγRIIB consiste en los segmentos de FR del segmento VH de de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda *et al.*, 1998, J. Exp. Med. 188:2151062) y JH6 (Ravetch *et al.*, 1981, Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR de un VH de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de SED ID NO: 1, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. En una realización, el VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

20 SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 29. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado comprende además una región VL, que consiste en los segmentos de FR del segmento de VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske *et al.*, 1992, Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) y JK4 (Hieter *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más regiones CDR de un VL de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, y SEQ ID NO: 27. En una realización, el VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 30, y

25 opcionalmente en combinación con uno de los VH de 2B6 a los que se hizo referencia anteriormente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene una cadena de VH y/o un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos

30 (H2B6VH-3) (SEQ ID NO: 3):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGVIDPSDTYP
 NYNKKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDDYYSGMDYWGQGT
 VTVSS

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene una cadena de VL y/o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos

35 (H2B6VL-5) (SEQ ID NO: 8):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTFTCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKEVSEISGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFITFGGGTKVEIK

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene una cadena de VH y/o un dominio de VH que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VH-3):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGVIDPSDTYP
 45 NYNKKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDDYYSGMDYWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 3), y una cadena de VL y/o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos (H2B6VL-5) (SEQ ID NO: 8):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTFTCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKEVSEISGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFITFGGGTKVEIK

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene un dominio VH y/o una cadena de VH que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VH, véase la figura 2):

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCEASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRNKAKNH
 ATYYAESVIGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCGALGLDYWGQGTTLTVSS
 55 (SEQ ID NO: 9).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene un dominio VL y/o VL cadena que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VL, véase la figura 3) (SEQ ID NO: 10):

DIOMTOSPSSLLAALGERVSLTCRASOEISGYLSWLOOKPDGTIKRLIYAASTLD SGV

5 PKRFSGSESGSDYSLTISSEDFADYYCLOYFSYPLTFGAGTKLELK

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento tiene un dominio VH y/o una cadena de VH que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VH) (SEQ ID NO: 9, véase la figura 2):

EVKLEESGGGLVOPGGSMKLSCEASGFTFSDAWMDWVROSPEKGLEWVAEIRNKAKNH

ATYYAESVIGRFTISRDDSKSSVYLOMNSLRAEDTGIYYCGALGLDYWGOGTTTLTVSS.

y un dominio VL y/o una cadena de VL que comprende la secuencia de aminoácidos (8B5.3.4 VL, véase la figura 3) (SEQ ID NO: 10):

DIOMTOSPSSLLAALGERVSLTCRASOEISGYLSWLOOKPDGTIKRLIYAASSTLD SGV

PKRFSGSESGDYSLTISSLESEDFADYYCLOYFSYPLTFGAGTKLELK

En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética según los métodos en el presente documento es un anticuerpo humanizado 3H7, en el que la región FcγRIIB VH consiste en los segmentos de FR de un segmento de VH de línea germinal humana y las regiones CDR del VH de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de SED ID NO: 37. En otra realización específica, el anticuerpo humanizado 3H7 comprende además una región VL, que consiste en los segmentos de FR de un segmento de VL de línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7VL, que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB, en la que el anticuerpo se une de manera inmuno-específica a un dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo, comprendiendo (o alternativamente, consistiendo en) dicho anticuerpo para FcγRIIB, secuencias de CDR de 2B6, 3H7 o 8B5.3.4 en cualquiera de las siguientes combinaciones: una CDR1 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; CDR2 de VH y CDR2 de VL; una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH y una CDR1 de VH; una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; o cualquier combinación de las mismas de las CDR de VH y las CDR de VL dadas a conocer en el presente documento.

En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con

isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 234 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina (MgFc155); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 300 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 292 con prolina; o una sustitución en la posición 243 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con fenilalanina.

6.1.6 CONJUGADOS DE POLIPÉPTIDO Y ANTICUERPO

Las moléculas descritas en el presente documento (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones tanto de manera covalente como de manera no covalente) a polipéptidos heterólogos (es decir, no polipéptido no relacionado; o porción del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa necesariamente, sino que puede producirse a través de secuencias ligadoras.

Además, las moléculas descritas en el presente documento (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden conjugarse a un agente terapéutico o un resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o restos farmacológicos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos de la química clásica. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antiviral de hierba carmín, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo, pero sin limitarse a, α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I tal como se da a conocer en la publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi *et al.*, J. Immunol., 6:1567-1574, 1994) y VEGF (publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas descritas en el presente documento (es decir, polipéptidos, anticuerpos) pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchas de las cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, Cell, 37:767 1984) y la etiqueta "flag" (Knappik *et al.*, Biotécnicas, 17(4):754-761, 1994).

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de intercambio de genes, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio de codones (denominadas colectivamente "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades de moléculas (por ejemplo, anticuerpos con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véanse, generalmente, las patentes estadounidenses n.ºs 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Patten *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, BioTechniques 24:308. Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden regiones Fc variantes, o los ácidos nucleicos que codifican para las moléculas descritas en el presente documento, pueden alterarse adicionalmente sometándose a mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifican para una molécula, pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

También se describen moléculas que comprenden regiones Fc variantes (es decir, anticuerpos, polipéptidos) conjugadas a un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la semivida sérica y/o dirigirse a un subconjunto particular de células. Las moléculas pueden usarse a nivel de diagnóstico para monitorizar, por ejemplo, el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para determinar, por ejemplo, la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Puede facilitarse la detección acoplando las moléculas a una sustancia detectable. Los

ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse o bien directamente a las moléculas o bien indirectamente, a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un

5 ligador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.741.900 para iones de metales que pueden conjugarse a anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico según la presente descripción. Tales diagnósticos y detección pueden lograrse acoplando las moléculas descritas en el presente documento a sustancias detectables incluyendo, pero sin limitarse a, diversas

10 enzimas, enzimas que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequorina; material radiactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto

15 (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{113}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones usando

20 diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden una región Fc variante pueden conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las

25 citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo,

30 metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimetabólicos

35 (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula descrita en el presente documento puede conjugarse a restos terapéuticos tales como a materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para ejemplos de materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-

40 tetraazaciclododecano-N,N,N',N''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula ligadora. Tales moléculas ligadoras se conocen habitualmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a anticuerpos se conocen bien; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, págs. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.*, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982.

50

En una realización, cuando la molécula descrita en el presente documento es un anticuerpo que comprende una región Fc variante, puede administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado al mismo, administrarse solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) para su uso como tratamiento terapéutico. Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal como describe Segal en la patente estadounidense n.º 4.676.980. También pueden unirse anticuerpos a soportes sólidos,

60 que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

6.2 EXAMEN DE MOLÉCULAS CON REGIONES Fc VARIANTES PARA UNIÓN A FcγRIII POTENCIADA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MISMAS

65

En realizaciones preferidas, se realizan el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) usando la tecnología de presentación en levaduras en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica, preferiblemente de una manera de alto rendimiento, tal como se describe en el presente documento o tal como se da a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis en equilibrio. En algunas realizaciones, se realizan el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) usando la tecnología de presentación en levaduras tal como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los ensayos basados en función pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones celulares efectoras mediadas por FcγR tales como las descritas en el presente documento en la sección 6.2.7. Los ejemplos no limitativos de funciones celulares efectoras que pueden usarse según los métodos en el presente documento, incluyen pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. En algunas realizaciones, se realizan el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA potenciada) usando la tecnología de presentación en levaduras tal como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ensayos basados en bioquímica en combinación o en paralelo con uno o más ensayos basados en función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento.

El término "unión específica" de una región Fc a un FcγR se refiere a una interacción de la región Fc y un FcγR particular que tiene una constante de afinidad de al menos aproximadamente 150 nM, en el caso de FcγRIIIA monomérico y al menos aproximadamente 60 nM en el caso de FcγRIIB dimérico tal como se determina usando, por ejemplo, un ensayo ELISA o de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, un ensayo BIAcore™). La constante de afinidad de una región Fc para FcγRIIIA monomérico puede ser de 150 nM, 200 nM o 300 nM. La constante de afinidad de una región Fc para FcγRIIB dimérico puede ser de 60 nM, 80 nM, 90 nM o 100 nM. Puede generarse FcγRIIB dimérico para su uso en los métodos en el presente documento usando métodos conocidos por un experto en la técnica. Normalmente, la región extracelular de FcγRIIB se une de manera covalente a un polipéptido heterólogo que puede producir dimerización, de modo que la proteína de fusión resultante es un dímero, por ejemplo, véase la solicitud estadounidense n.º 60/439.709 presentada el 13 de enero de 2003 (expediente de apoderado n.º 11183-005-888). Una interacción específica generalmente es estable en condiciones fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, condiciones que se producen en un individuo vivo tal como un ser humano u otro vertebrado o invertebrado, así como condiciones que se producen en un cultivo celular tales como las condiciones usadas para mantener y cultivar células de mamífero o células de otro organismo vertebrado o un organismo invertebrado.

En una realización específica, el examen y la identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes y afinidades por FcγR alteradas comprenden: presentar la molécula que comprende una región Fc variante en la superficie de la levadura; y caracterizar la unión de la molécula que comprende la región Fc variante a un FcγR (uno o más), usando un ensayo bioquímico para determinar la interacción Fc-FcγR, preferiblemente, un ensayo basado en ELISA. Una vez que se ha caracterizado la molécula que comprende una región Fc variante por su interacción con uno o más FcγR y se determina que tiene una afinidad alterada por uno o más FcγR, mediante al menos un ensayo de base bioquímica, por ejemplo, un ensayo ELISA, la molécula puede modificarse por ingeniería genética para dar una inmunoglobulina completa, usando métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales conocidos en la técnica, y la inmunoglobulina que comprende la región Fc variante expresada en células de mamífero para caracterización bioquímica adicional. La inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante (por ejemplo, reemplazando la región Fc de la inmunoglobulina) puede ser cualquier inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. En realizaciones preferidas, se introduce una región Fc variante en una inmunoglobulina específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno de cáncer. La inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante puede unirse específicamente a un antígeno de cáncer o tumoral por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, antígeno de carcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, Cancer Res. 51(2): 468-475), fosfato ácido prostático (Taylor *et al.*, 1990, Nucl. Ácidos Res. 18(16): 4928), antígeno prostático específico (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2): 903-910; Israeli *et al.*, 1993, Cancer Res. 53: 227-230), antígeno asociado a melanoma p97 (Estin *et al.*, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6): 445-446), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl *et al.*, 1990, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, Cancer 59: 55-63; Mittelman *et al.*, 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144), antígeno prostático específico de membrana, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulo de grasa de leche humana, antígenos asociados con tumor

colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, J. Clin. Immunol. 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff *et al.*, 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430),
5 antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250), tipo de antígeno de superficie celular de trasplante específico de tumor (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos por virus incluyendo virus de ADN de tumor de antígeno T y antígenos de envoltura de virus de ARN de tumor, antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*, 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico),
15 antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), antígeno de linfocito humano maligno-APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, Science 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en eritrocitos fetales, antígeno I de endodermo primario que se encuentra en eritrocitos de adultos, embriones antes de la implantación, I(Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 que se encuentra en epitelio de mama, SSEA-1 que se encuentra en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D₁56-22 que se encuentra en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 que se encuentra en adenocarcinoma de colon, F3 que se encuentra en adenocarcinoma de pulmón, AH6 que se encuentra en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y que se encuentra en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF que se encuentra en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) que se encuentra en cáncer de páncreas, FC10.2 que se encuentra en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) que se encuentra en adenocarcinoma, NS-10 que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 que se encuentra en receptor de EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo AL^e/Le^y) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, 19.9 que se encuentra en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ que se encuentra en células mieloides, R₂₄ que se encuentra en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y
20 M1:22:25:8 que se encuentran en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 que se encuentran en embriones en una fase de 4-8 células. En una realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase, Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

La unión de la variante de Fc a un FcγR puede activar un efector celular que selecciona como diana células que
35 microalinean un antígeno de cáncer tal como A33 (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. *et al.* 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); beta-catenina (Prange W. *et al.* 2003 J Pathol. 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. *et al.* 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Supl. 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. *et al.* 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73); CD19 (Troussard, X. *et al.* 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. *et al.* 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. *et al.* 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5:294:91-107); CD25 (Troussard, X. *et al.* 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. *et al.* 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40);
45 CD79a/CD79b (Troussard, X. *et al.* 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. *et al.* 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al.* 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. *et al.* 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA (antígeno carcinoembrionario; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. *et al.* 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. *et al.* 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. *et al.* 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al.* 2002 Oncogene 21(57):8732-40; Rimon, E. *et al.* 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al.* 2006 Int J Cancer. 118(1):123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *et al.* 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. *et al.* 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S *et al.* 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); E6 de virus del papiloma humano/E7 de virus del papiloma humano (DiMaio, D. *et al.* 2006 Adv Virus Res. 66:125-59); KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al.* 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82); MUC-1 (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al.* 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); N-acetilglucosaminiltransferasa (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6:1473(1):21-34); p15 (Gil, J. *et al.* 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); PSA (antígeno prostático específico; Cracco, C.M. *et al.* 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); receptor de TNF (receptor de TNF-α, receptor de TNF-β; o receptor de TNF-γ; van Horssen, R. *et al.* 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al.* 2000 Curr Drug Targets. 1(4):327-64); o receptor de VEGF (O'Dwyer, P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-8). También son de interés antígenos específicos para
55 agentes infecciosos particulares, por ejemplo, agentes virales incluyendo, pero sin limitarse a virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), influenza, virus del papiloma humano (VPH), glosopeda (virus de Coxsackie), el virus de la rabia, el virus de herpes simple (VHS), y los agentes causantes de

gastroenteritis, incluyendo rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus de Norwalk; agentes bacterianos incluyendo, pero sin limitarse a *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*, agentes fúngicos y parásitos tales como *Giardia*.

En algunas realizaciones, una región Fc variante descrita en el presente documento se introduce en un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz *et al.*, 1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995). En otras realizaciones, una región Fc variante se introduce en un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico de ratón-humano 2H7, que reconoce la fosfoproteína de superficie celular CD20 en células B (Liu *et al.*, 1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6). En aún otras realizaciones, una región Fc variante se introduce en un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (p185 HER2) tal como se describe por Carter *et al.* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9). En aún otras realizaciones, una región Fc variante se introduce en un anti-TAG72 humanizado (CC49) (Sha *et al.*, 1994 Cancer Biother. 9(4): 341-9). En otras realizaciones, una región Fc variante se introduce en Rituxan que se usa para tratar linfomas.

También se describe la modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti-FcγRIIB incluyendo pero sin limitarse a cualquiera de los anticuerpos dados a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/02157667; 2004/0185045; 2005/0260213; o 2006/013810; las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 2005/110474 o WO 2005/115452; la solicitud de patente estadounidense 11/305.787 presentada el 15 de diciembre de 2005; o las solicitudes provisionales n.ºs 60/809.116; 60/816.126; o 60/816.688 presentadas el 26 de mayo de 2006, el 23 de junio de 2006 o el 26 de junio de 2006, respectivamente mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, delección) de al menos una modificación de residuo de aminoácido que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB, que pueden humanizarse o no, que pueden modificarse por ingeniería genética según los métodos en el presente documento son el anticuerpo 2B6 monoclonal que tiene el número de registro ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene el número de registro ATCC PTA-4592, el anticuerpo monoclonal 1D5 que tiene el número de registro ATCC PTA-5958, el anticuerpo monoclonal 1F2 que tiene el número de registro ATCC PTA-5959, el anticuerpo monoclonal 2D11 que tiene el número de registro ATCC PTA-5960, el anticuerpo monoclonal 2E1 que tiene el número de registro ATCC PTA-5961 y el anticuerpo monoclonal 2H9 que tiene el número de registro ATCC PTA-5962 (todos depositados en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En aún otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado por ingeniería genética puede tener además una función efectora potenciada tal como se determina mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica y dados a conocer y ejemplificados en el presente documento. En algunas realizaciones, una región Fc variante se introduce en un anticuerpo terapéutico monoclonal específico para un antígeno de cáncer o receptor de superficie celular incluyendo, pero sin limitarse a, Erbitux™ (también conocido como IMC-C225) (ImClone Systems Inc.), un anticuerpo monoclonal quimerizado contra EGFR; HERCEPTIN® (trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor, para la prevención de rechazo agudo de aloinjerto renal. Otros ejemplos son un anticuerpo anti-F(ab')₂ de CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un anticuerpo anti-F(ab')₂ de CD18 humanizado (Celltech, R.U.); PRO542 que es un anticuerpo anti-gp120 de VIH fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); C14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); OVAREX™ que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-IA murino (Glaxo Wellcome/Centocor); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-integrina αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD52 humanizado (Leukositio); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zetkyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); Smart ID10 que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYM™ (Lym-1) es un anticuerpo anti-HLA-DR murino radiomarcado (Techniclone); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genetech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento (C5) humanizado (Alexion Pharm); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF-α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti-α4β7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo anti-CD64 humano (FcγR) (Medarex/Centocor); rhuMab-E25 es un anticuerpo IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharm); ABX-

CBL es un anticuerpo IgM anti-CD-147 murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG anti-CD2 de rata (Medimmune/Bio Transplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a anti-CD3 murino (ortho Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo IgG anti-integrina β_2 humanizado (LeukoSite); Anti-LFA-1 es un anticuerpo anti-F(ab')₂ de CD18 murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β_2 humano (Cambridge Ab Tech); y Corsevin M es un anticuerpo anti-factor VII quimérico (Centocor).

Las regiones Fc variantes, preferiblemente en el contexto de una inmunoglobulina, pueden caracterizarse adicionalmente usando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. En algunas realizaciones alternativas, las regiones Fc variantes no se introducen en una inmunoglobulina y se caracterizan adicionalmente usando uno o más ensayos de base bioquímica y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar interacciones Fc-Fc γ R, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, y ensayo basado en resonancia de plasmón superficial para determinar los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, por ejemplo, ensayo BIAcore. El uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones celulares efectoras mediadas por Fc γ R tal como conoce un experto en la técnica o se describe en el presente documento. En realizaciones específicas, las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes se someten a ensayo en un ensayo ELISA para la unión a uno o más Fc γ R, por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA; seguido por uno o más ensayos de ADCC. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes se someten a ensayo adicionalmente usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Se conocen bien en la técnica ensayos basados en resonancia de plasmón superficial, y se comentan adicionalmente en la sección 6.2.7, y se ejemplifican en el presente documento en el ejemplo 7.8.

Un ensayo de alto rendimiento a modo de ejemplo para caracterizar inmunoglobulinas que comprenden regiones Fc variantes puede comprender: introducir una región Fc variante, por ejemplo, mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales, en un anticuerpo 4-4-20; caracterizar la unión específica del anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante a un Fc γ R (por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB) en un ensayo ELISA; caracterizar el anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante en un ensayo de ADCC (usando métodos dados a conocer en el presente documento) en el que se opsonizan las células diana con el anticuerpo 4-4-20 que comprende la región Fc variante; la región Fc variante puede clonarse entonces en una segunda inmunoglobulina, por ejemplo, 4D5, 2H7, y esa segunda inmunoglobulina caracterizarse en un ensayo de ADCC, en el que se opsonizan las células diana con el segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante. El segundo anticuerpo que comprende la región Fc variante se analiza entonces adicionalmente usando un ensayo basado en ELISA para confirmar la unión específica a un Fc γ R.

Preferiblemente, una región Fc variante se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad mayor que una región Fc de tipo natural tal como se determina en un ensayo ELISA. Lo más preferiblemente, una región Fc variante se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad mayor y se une a Fc γ RIIB con una afinidad menor que una región Fc de tipo natural tal como se determina en un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, la región Fc variante se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad al menos 2 veces mayor, al menos 4 veces mayor, más preferiblemente al menos 6 veces mayor, lo más preferiblemente al menos de 8 a 10 veces mayor que aquella con la que una región Fc de tipo natural se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA y se une a Fc γ RIIB con una afinidad al menos 2 veces menor, al menos 4 veces menor, más preferiblemente al menos 6 veces menor, lo más preferiblemente al menos de 8 a 10 veces menor que aquella con la que una región Fc de tipo natural se une a Fc γ RIIB tal como se determina en un ensayo ELISA.

La inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes pueden analizarse en cualquier punto usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore, para definir los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, usando métodos dados a conocer en el presente documento y que conocen los expertos en la técnica. Preferiblemente, la K_d de una región Fc variante para la unión a un Fc γ RIIIA monomérico y/o Fc γ RIIA tal como se determina mediante análisis de BIAcore es de aproximadamente 100 nM, preferiblemente de aproximadamente 70 nM, lo más preferiblemente de aproximadamente 40 nM.; y la K_d de la región Fc variante para la unión a Fc γ RIIB dimérico es de aproximadamente 80 nM, aproximadamente 100 nM, más preferiblemente de aproximadamente 200 nM.

En la mayoría de las realizaciones preferidas, la inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes se caracteriza adicionalmente en un modelo animal para la interacción con un Fc γ R. Modelos animales preferidos para su uso en los métodos son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan Fc γ R humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.877.397 y 6.676.927. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones desnudos con desactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIIA humano; ratones desnudos con desactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIA humano; ratones desnudos con desactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIB humano y Fc γ RIIIA humano; ratones desnudos con desactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIB humano y Fc γ RIIA humano; ratones desnudos con desactivación de Fc γ RIIIA y

FcγRIIA que portan FcγRIIIA y FcγRIIA humanos y ratones desnudos con desactivación de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB que portan FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humanos.

6.2.1 ESTRATEGIAS DE DISEÑO

También se describen métodos de modificación por ingeniería genética para generar variantes de Fc incluyendo pero sin limitarse a estrategias de diseño por ordenador, métodos de generación de bibliotecas y métodos de producción y examen experimentales. Estas estrategias pueden aplicarse individualmente o en diversas combinaciones para modificar por ingeniería genética las variantes de Fc descritas en el presente documento.

En la mayoría de las realizaciones preferidas, los métodos de modificación por ingeniería genética comprenden métodos en los que no se modifican los aminoácidos en la superficie de contacto entre una región Fc y el ligando de Fc. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a FcγR, C1q, FcRn, C3, receptor de manosa, proteína A, proteína G, receptor de manosa, y moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los aminoácidos en la superficie de contacto entre una región Fc y un ligando de Fc se definen como aquellos aminoácidos que realizan un contacto directo y/o indirecto entre la región Fc y el ligando, desempeñan un papel estructural en determinar la conformación de la superficie de contacto, o están dentro de al menos 3 ángstroms, preferiblemente al menos 2 ángstroms entre sí, tal como se determina mediante análisis estructural, tal como cristalografía de rayos X y modelado molecular. Los aminoácidos en la superficie de contacto entre una región Fc y un ligando de Fc incluyen aquellos aminoácidos que realizan un contacto directo con un FcγR basándose en el análisis cristalográfico y estructural de interacciones de Fc-FcγR tales como las descritas por Sondermann *et al.*, (2000, Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región de bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G). En algunas realizaciones, las moléculas que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que no realiza un contacto directo con un FcγR basándose en el análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no están dentro del sitio de unión a Fc-FcγR.

Preferiblemente, los métodos de modificación por ingeniería genética no modifican ninguno de los aminoácidos tal como se identificó por Shields *et al.*, que se localizan en el dominio CH2 de una región Fc proximal a la región de bisagra, por ejemplo, Leu234-Pro238; Ala327, Pro329, y afectan a la unión de una región Fc a todos los FcγR humanos.

También se describen variantes de Fc con afinidades por FcγR alteradas y/o funciones efectoras alteradas, de modo que la variante de Fc no tiene una modificación de aminoácido en una posición en la superficie de contacto entre una región Fc y el ligando de Fc. Preferiblemente, tales variantes de Fc en combinación con una o más de otras modificaciones de aminoácidos que están en la superficie de contacto entre una región Fc y el ligando de Fc tienen un impacto adicional sobre la propiedad alterada particular, por ejemplo, afinidad por FcγR alterada. La modificación de aminoácidos en la superficie de contacto entre Fc y un ligando de Fc puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo basados en el análisis estructural de complejos Fc-ligando. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, explorando sustituciones energéticamente favorables en las posiciones de Fc que afectan a la superficie de contacto de unión, pueden modificarse por ingeniería genética variantes que muestran nuevas conformaciones de superficie de contacto, algunas de las cuales pueden mejorar la unión al ligando de Fc, algunas de las cuales pueden reducir la unión del ligando de Fc, y algunos de los cuales pueden tener otras propiedades favorables. Tales nuevas conformaciones de superficie de contacto podrían ser el resultado de, por ejemplo, la interacción directa con residuos de ligando de Fc que forman la superficie de contacto, o efectos indirectos producidos por las modificaciones de aminoácidos tales como la perturbación de las conformaciones de la cadena lateral o la estructura principal.

También se describe la modificación por ingeniería genética de variantes de Fc que comprende cualquiera de las modificaciones de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento en combinación con otras modificaciones en las que se altera la conformación del hidrato de carbono de Fc en la posición 297. También se describen cambios conformacionales y composicionales en el hidrato de carbono N297 que dan como resultado una propiedad deseada, por ejemplo afinidad aumentada o reducida por un FcγR. Tales modificaciones pueden potenciar adicionalmente el fenotipo de la modificación de aminoácido original de las variantes de Fc. Aunque sin pretender restringirse a un mecanismo de acción particular una estrategia de este tipo está apoyada por la observación de que la conformación y la estructura de hidratos de carbono afecta notablemente a la unión Fc-FcγR y Fc/CI q (Umaha *et al.*, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:45539; Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields *et al.* 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473).

Se proporciona otra estrategia de diseño para generar variantes de Fc según la descripción en el presente documento en la que se vuelve a modificar por ingeniería genética la región Fc para eliminar la dependencia estructural y funcional sobre la glicosilación. Esta estrategia de diseño implica la optimización de la estructura, estabilidad, solubilidad de Fc y/o la función de Fc (por ejemplo, la afinidad de Fc por uno o más ligandos de Fc) en ausencia del hidrato de carbono N297. En un enfoque, se modifican por ingeniería genética posiciones que se

exponen a disolvente en ausencia de glicosilación de modo que sean estables, estructuralmente compatibles con la estructura de Fc y no tengan tendencia a agregarse. Los enfoques para optimizar la Fc no glicosilada pueden implicar pero no se limitan a diseñar modificaciones de aminoácidos que potencian la estabilidad y/o solubilidad de la Fc no glicosilada incorporando residuos polares y/o cargados que se orientan hacia el interior hacia el eje dimérico Cg2-Cg2, y diseñando modificaciones de aminoácidos que potencian directamente la superficie de contacto de Fc-FcγR no glicosilado o la superficie de contacto de Fc no glicosilada con algún otro ligando de Fc.

Las variantes de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, incluyendo pero sin limitarse a modificaciones que alteran la función efectora. También se describe combinar una variante de Fc descrita en el presente documento con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Tales modificaciones pueden ser en los dominios CH1, CH2 o CH3 o en una combinación de los mismos. Preferiblemente, las variantes de Fc potencian la propiedad de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante de Fc se combina con un mutante que se sabe que se une a FcγRIIIA con mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural; la combinación con un mutante descrito en el presente documento da como resultado una potenciación de más veces de la afinidad por FcγRIIIA.

En una realización, las variantes de Fc pueden combinarse con otras variantes de Fc conocidas tales como las dadas a conocer en Duncan *et al.*, 1988, Nature 332:563-564; Lund *et al.*, 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund *et al.*, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre *et al.*, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis *et al.*, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund *et al.*, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis *et al.*, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund *et al.*, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour *et al.*, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie *et al.*, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy *et al.*, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie *et al.*, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta *et al.*, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; documento US 5.624.821; documento US 5.885.573; documento US 6.194.551; documento PCT WO 00/42072; documento PCT WO 99/58572.

6.2.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON REGIONES Fc VARIANTES

También se describe la caracterización de las moléculas descritas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante identificada mediante la tecnología de presentación en levaduras y ensayos de unión de FcγR-Fc dados a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y en la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351; o anticuerpos terapéuticos monoclonales modificados por ingeniería genética según los métodos en el presente documento) usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar la función celular efectora de las moléculas. También se describe la caracterización de las moléculas para determinar la función celular efectora mediada por FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden someterse a ensayo, incluyen pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Puede usarse cualquier ensayo basado en células o libre de células conocido por los expertos en la técnica para determinar la función celular efectora actividad (para ensayos de células efectoras, véase Perussia *et al.*, 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini *et al.*, 1998 Experientia, 44(10): 841-8; Lehmann *et al.*, 2000 J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn *et al.*, 1990 J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid *et al.*, 2002 Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding *et al.*, 1998, Immunity 8:403-411).

En una realización, las moléculas pueden someterse a ensayo para determinar la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Alternativamente, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas puede someterse a ensayo en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Brown EJ. 1994, Methods Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas se caracteriza midiendo la capacidad de células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados por IgG unidos a fluoresceína mediante métodos descritos anteriormente (Tridandapani *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo a modo de ejemplo para medir la fagocitosis de las moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades potenciadas por FcγRIIIA, comprende: tratar células THP-1 con una molécula descrita en el presente documento o con un anticuerpo de control que no se une a FcγRIIIA, comparar los niveles de actividad de dichas células, en el que una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se une a SRBC recubiertos por IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1) y la tasa fagocítica, indicaría la funcionalidad de la molécula. Un experto en la técnica puede apreciar que este ensayo a modo de ejemplo puede usarse para someter a ensayo cualquiera de las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento.

Otro ensayo a modo de ejemplo para determinar la fagocitosis de las moléculas es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana tal como

Escherichia coli marcada con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo natural, un anticuerpo frente a fluoresceína (véase Bedzyk *et al.*, 1989, J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que desactiva la unión a FcγRIII, como un control de fondo para ADCP dependiente de FcγR (iii) anticuerpo 4-4-20 que porta regiones Fc variantes identificadas mediante los métodos en el presente documento y producidas tal como se ejemplifica en el ejemplo 7.6; y formar la partícula opsonizada; añadir cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible de ATCC) en una razón de 60:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por FcγR; preferiblemente incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37°C durante 1,5 horas; añadir azul tripano tras la incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 min) a las células para extinguir la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin internalizarse; transferir las células a tampón FACS (por ejemplo, BSA al 0,1% en PBS, azida sódica al 0,1%,), analizar la fluorescencia de las células THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 usadas en el ensayo se analizan mediante FACS para determinar la expresión de FcγR sobre la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto CD32A como CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea en la realización del ensayo de ADCP según los métodos en el presente documento. Las células THP-1 se bloquean preferiblemente con IgG1 soluble 100 µg/ml o suero humano al 10%. Para analizar el grado de ADCP, la compuerta se fija preferiblemente en células THP-1 y se mide la mediana de intensidad de fluorescencia. Se calcula la actividad de ADCP para mutantes individuales y se notifica como un valor normalizado para el chAcM 4-4-20 obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a las células THP-1 de modo que la razón de las partículas opsonizadas con respecto a las células THP-1 es de 30:1 ó 60:1. En la mayoría de las realizaciones preferidas, el ensayo de ADCP se realiza con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para servir como actividad de ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo natural (para servir como actividad de ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (para servir como el control de fondo para la actividad de ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas pueden someterse a ensayo para determinar la actividad de ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (véase por ejemplo, Perussia *et al.*, 2000, Methods Mol. Biol. 121: 179-92). Un ensayo a modo de ejemplo para determinar la actividad de ADCC de las moléculas se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula permeable de la membrana celular se usa comúnmente para el marcaje puesto que se une a proteínas citoplasmáticas y aunque se libera espontáneamente de las células con cinéticas lentas, se libera masivamente tras la necrosis de la célula diana); opsonizar las células diana con las moléculas que comprenden regiones Fc variantes; combinar las células diana radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación a una razón apropiada de células diana con respecto a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37°C; recoger los sobrenadantes; y analizar la radioactividad. Entonces puede determinarse la citotoxicidad de las moléculas, por ejemplo usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental – cpm de fuga de diana)/(cpm de lisis con detergente – cpm de fuga de diana) x 100%. Alternativamente, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas - % de lisis en ausencia de las moléculas. Puede generarse un gráfico variando o bien la razón de célula diana:efectora o bien la concentración de anticuerpo.

En aún otra realización, las moléculas se caracterizan por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) véase, por ejemplo, Ding *et al.*, Immunity, 1998, 8:403-11.

Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC descritos en el presente documento son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente de sangre humana normal, usando métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos en el presente documento expresan diferentes receptores activantes FcγR. También se describen células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan tanto FcγRIIA como FcγRIIB, para determinar si los mutantes de anticuerpo frente a Fc muestran fagocitosis y actividad de ADCC aumentadas en relación con los anticuerpos IgG1 de tipo natural.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis a través de la expresión del receptor FcγRI de alta afinidad y el receptor FcγRIIA de baja afinidad (Fleit *et al.*, 1991, J. Leuk. Biol. 49: 556). Las células THP-1 no expresan de manera constitutiva FcγRIIA ni FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas efectúa el patrón de expresión de FcR (Pricop *et al.*, 2000 J. Immunol. 166: 531-7). El crecimiento de células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y produce una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede potenciarse mediante densidad celular aumentada (Tridandapani *et al.*, 2002, J. Biol Chem. 277: 5082-9). En cambio, se ha notificado que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIA (Pearse *et al.*, 1993 PNAS USA 90: 4314-8). La presencia o ausencia de receptores sobre la superficie celular puede determinarse mediante FACS usando métodos comunes conocidos por un experto en la técnica. La expresión inducida por citocina de FcγR sobre la superficie celular proporciona un sistema para someter a prueba tanto la

activación como la inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no pueden expresar FcγRIIB, la descripción también abarca otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian de manera terminal para dar macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren *et al.*, 1979, Nature 279: 328-331).

La destrucción de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por macrófagos y células NK en modelos tumorales de ratón (Clynes *et al.*, 1998, PNAS USA, 95: 652-656). La descripción abarca el uso de monocitos sometidos a elutriación de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de los mutantes de Fc para desencadenar citotoxicidad celular de células diana tanto en ensayos de fagocitosis como de ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. Puede determinarse la expresión de FcγR a partir de monocitos sometidos a elutriación congelados, monocitos sometidos a elutriación nuevos, monocitos mantenidos en FBS al 10% y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y o en suero humano usando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden teñirse con anticuerpos específicos para FcγR y analizarse mediante FACS para determinar los perfiles de FcR. Entonces se usan condiciones que imitan mejor la expresión de FcγR *in vivo* en macrófagos para los métodos en el presente documento.

También se describe el uso de células de ratón especialmente cuando no pueden obtenerse células humanas con los perfiles de FcγR correctos. También se describe la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (ATCC) que puede transfectarse con FcγRIIA humano y los transfectantes estables pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph *et al.*, J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para determinar la expresión de FcγRIIA mediante análisis de FACS usando experimentación de rutina y pueden usarse elementos de alta expresión en los ensayos de ADCC descritos en el presente documento. También se describe el aislamiento de macrófagos peritoneales esplénicos que expresan FcγR humano a partir de ratones transgénicos desactivados tales como los descritos en el presente documento.

Pueden recogerse linfocitos de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población de células mononucleares aisladas, la mayoría de la actividad de ADCC se produce a través de los linfocitos citolíticos naturales (NK) que contienen FcγRIIA pero no FcγRIIB sobre su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes sobre el desencadenamiento de la ADCC de células NK y establecen los reactivos para someter a prueba con monocitos sometidos a elutriación.

Las células diana usadas en los ensayos de ADCC descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de registro de ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp *et al.*, 1976, Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de registro de ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein *et al.*, 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células Daudi con número de registro de ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, 1968, Cancer Res. 28: 1300-10). Las células diana deben reconocerse por el sitio de unión al antígeno de la inmunoglobulina que va a someterse a ensayo.

El ensayo de ADCC se basa en la capacidad de las células NK para mediar muerte celular a través de una ruta apoptótica. Las células NK median muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIA de IgG unida a un antígeno sobre una superficie celular. Los ensayos de ADCC usados según los métodos en el presente documento pueden ser ensayos basados en radiactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar células diana, por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, células Daudi, opsonizar células diana con un anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular sobre la célula diana a través de su sitio de unión a antígeno; combinar la célula diana opsonizada marcada y las células efectoras con una razón apropiada, que puede determinarse mediante experimentación de rutina; recoger las células; detectar el marcador en el sobrenadante de las células diana lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en el marcador usado. Las células diana pueden marcarse o bien con un marcador radiactivo o bien con un marcador fluorescente, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los marcadores incluyen, pero no se limitan a, [⁵¹Cr]Na₂CrO₄; y el éster de acetoximetilo del ligando de potenciación de fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA).

En una realización específica preferida, se usa un ensayo fluorimétrico de resolución temporal para medir la actividad de ADCC contra células diana que se han marcado con el éster de acetoximetilo del ligando de potenciación de fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA). Tales ensayos fluorimétricos se conocen en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg *et al.*, 1996, Journal of Immunological Methods, 193: 199-206. En resumen, las células diana se marcan con el diéster de acetoximetilo de TDA (2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo)), (BATDA), permeable de membrana, que difunde rápidamente a través de la membrana celular de las células viables. Las esterases intracelulares dividen los grupos éster y la molécula de TDA impermeable de membrana regenerada queda atrapada dentro de la célula. Tras la incubación de las células efectoras y diana, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo el 5% de CO₂, el TDA liberado de las células diana lisadas se quela con Eu³⁺ y se cuantifica la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados en un fluorímetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac).

En otra realización específica, el ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas que comprenden regiones Fc variantes comprende las siguientes etapas: Preferiblemente, se marcan $4-5 \times 10^6$ células diana (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) con 2,2':6',2"-terpiridina-t-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficacia de marcaje óptima, el número de células diana usado en el ensayo de ADCC no debe superar preferiblemente 5×10^6 . Se añade el reactivo BATDA a las células y se incuba la mezcla a 37°C preferiblemente bajo el 5% de CO₂, durante al menos 30 minutos. Entonces se lavan las células con tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfonpirazol 0,125 mM, y medios que contienen sulfonpirazol 0,125 mM. Entonces se opsonizan (se recubren) las células diana marcadas con una molécula que comprende una región Fc variante, es decir, una inmunoglobulina que comprende una región Fc variante, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo de ADCC es específica para un receptor de la superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno de cáncer. La inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante puede unirse específicamente a cualquier antígeno de cáncer o tumoral, tal como los enumerados en la sección 6.4. Adicionalmente, la inmunoglobulina en la que se introduce una región Fc variante puede ser cualquier anticuerpo terapéutico específico para un antígeno de cáncer, tal como los enumerados en la sección 6.4. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo de ADCC es un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz *et al.*, 1982 J. Biol. Chem. 257(12): 6987-6995), un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico de ratón-ser humano 2H7 (Liu *et al.*, 1987, Journal of Immunology, 139: 3521-6); o un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (p185 HER2) (Carter *et al.* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9). Las células diana en el ensayo de ADCC se eligen según la inmunoglobulina en la que se ha introducido una región Fc variante de modo que la inmunoglobulina se une a un receptor de la superficie celular de la célula diana específicamente. Preferiblemente, los ensayos de ADCC se realizan usando más de un anticuerpo modificado por ingeniería genética, por ejemplo, anti Her2/neu, 4-4-20, 2B6, Rituxan y 2H7, que albergan las variantes de Fc. En la realización más preferida, las variantes de Fc se introducen en al menos 3 anticuerpos y se someten a prueba sus actividades de ADCC. Aunque sin pretender restringirse a un mecanismo de acción particular, examinar al menos 3 anticuerpos en estos ensayos funcionales disminuirá la posibilidad de eliminar erróneamente la mutación de Fc viable.

Las células diana opsonizadas se añaden a células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir razones de efector:diana de aproximadamente 50:1, 75:1 ó 100:1. En una realización específica, cuando la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante tiene el dominio variable de 4-4-20, la razón de efector:diana es de 75:1. Las células efectoras y células diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo el 5% de CO₂. Se recogen los sobrenadantes celulares y se añaden a una disolución ácida de europio (por ejemplo, disolución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). Se cuantifica la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados en un fluorímetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). Se determinan la liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) mediante la incubación de las células diana con TX-100 al 1% y medios solos, respectivamente. Se mide la citotoxicidad celular independiente de anticuerpo (AICC) mediante la incubación las células diana y efectoras en ausencia de anticuerpo. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. Se calcula el porcentaje medio de la lisis específica como:

$$\text{Liberación experimental (ADCC)} = (\text{AICC}) / (\text{MR} - \text{SR}) \times 100.$$

También se describe la caracterización de las variantes de Fc en ensayos de ADCC tanto dependientes de NK como dependientes de macrófagos. Las variantes de Fc tienen fenotipos alterados tales como una función efectora alterada tal como se somete a ensayo en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos.

También se describen ensayos conocidos en la técnica y se ejemplifican en el presente documento, para unir C1q y mediar citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para determinar la unión a C1q, puede realizarse un ELISA de unión a C1q. Un ensayo a modo de ejemplo puede comprender lo siguiente: pueden recubrirse placas de ensayo durante la noche a 4°C con variante polipeptídica o polipéptido de partida (control) en tampón de recubrimiento. Entonces pueden lavarse y bloquearse las placas. Tras el lavado, puede añadirse una alícuota de C1q humana a cada pocillo e incubarse durante 2 h a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, pueden añadirse 100 ul de un anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-C1q de complemento de oveja a cada pocillo e incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa puede lavarse de nuevo con tampón de lavado y pueden añadirse 100 ul de tampón sustrato que contiene OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)) a cada pocillo. Puede permitirse que la reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, continúe durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 ul de 4,5 NH₂ SO₄. Entonces puede leerse la absorbancia a (492-405) nm.

Una variante preferida es una que muestra una reducción significativa en la unión a C1q, tal como se detecta y se mide en este ensayo o en un ensayo similar. Preferiblemente, la molécula que comprende una variante de Fc presenta una reducción de aproximadamente 50 veces, aproximadamente de 60 veces, aproximadamente de 80 veces o una reducción de aproximadamente 90 veces en la unión a C1q en comparación con un anticuerpo de control que tiene una región Fc de IgG1 no mutada. En la realización más preferida, la molécula que comprende una

variante de Fc no se une a C1q, es decir la variante presenta una reducción de aproximadamente 100 veces o más en la unión a C1q en comparación con el anticuerpo de control.

Otra variante a modo de ejemplo es una que tiene una afinidad de unión mejor para C1q humana que la molécula que comprende la región Fc de tipo natural. Una molécula de este tipo puede presentar, por ejemplo, una mejora de aproximadamente dos veces o más, y de manera preferible de aproximadamente cinco veces o más, en la unión a C1q humana en comparación con la molécula parental que comprende la región Fc de tipo natural. Por ejemplo, la unión a C1q humana puede mejorarse en de aproximadamente dos veces a aproximadamente 500 veces, y preferiblemente desde aproximadamente dos veces o desde aproximadamente cinco veces hasta aproximadamente 1000 veces en comparación con la molécula que comprende la región Fc de tipo natural.

Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996). En resumen, pueden diluirse diversas concentraciones de la molécula que comprende una región Fc variante y complemento humano con tampón. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula que comprende una región Fc variante pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Pueden añadirse mezclas de la molécula que comprende una región Fc variante, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano y permitirse que se incube durante 2 h a 37°C y el 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por complemento. Entonces pueden añadirse 50 µl de azul de Alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubarse durante la noche a 37°C. La absorbancia se mide usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativas (RFU). Las concentraciones de muestra pueden calcularse a partir de una curva patrón y se notifica la actividad en porcentaje en comparación con la molécula no variante, es decir, una molécula que comprende la región Fc de tipo natural, para la variante de interés.

En algunas realizaciones, una variante de Fc no activa el complemento. Preferiblemente, la variante no parece tener ninguna actividad de CDC en el ensayo de CDC anterior. También se describe una variante con CDC potenciada en comparación con una molécula parental (una molécula que comprende la región Fc de tipo natural), por ejemplo, que presentan una mejora de aproximadamente dos veces a aproximadamente 100 veces en la actividad de CDC *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en los valores de CI50 para cada molécula que está comparándose). Los ensayos de complemento pueden realizarse con suero de cobaya, conejo o ser humano. La lisis mediada por complemento de las células diana puede detectarse monitorizando la liberación de enzimas intracelulares tales como lactato deshidrogenasa (LDH), tal como se describe en Korzeniewski *et al.*, 1983 Immunol. Methods 64(3): 313-20; y Decker *et al.*, 1988 J. Immunol Methods 115(1): 61-9; o la liberación de un marcador intracelular tal como europio, cromo 51 o indio 111 en que las células diana se marcan tal como se describe en el presente documento.

6.2.3 OTROS ANÁLISIS

Las moléculas que comprenden regiones Fc variantes también pueden someterse a ensayo usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de unión de interacción Fc-FcγR. Puede usarse cualquier instrumento de SPR disponible comercialmente incluyendo, pero sin limitarse a, instrumentos BIAcore, disponibles de Biacore AB (Uppsala, Suecia); instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, RU), sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón) y detector SPR Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX). Para una revisión de la tecnología basada en SPR véase Mullet *et al.*, 2000, Methods 22: 77-91; Dong *et al.*, 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash *et al.*, 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich *et al.*, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Adicionalmente, se contempla cualquiera de los instrumentos de SPR y los métodos basados en SPR para medir interacciones proteína-proteína descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125 en los métodos en el presente documento.

En resumen, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro de un par de unión sobre una superficie y monitorizar su interacción con el otro miembro del par de unión en disolución en tiempo real. La SPR se basa en medir el cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce con la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es la base de la tecnología de SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una capa fina de oro y constituye la base para una variedad de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores está disponible comercialmente en especial de las empresas enumeradas anteriormente, pudiendo usarse todos ellos en los métodos en el presente documento. Los ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, chip sensor CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula puede inmovilizarse sobre la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos de inmovilización y productos químicos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, unión de biotina a superficie recubierta con avidina, acoplamiento de aldehído a grupos de hidratos de carbono y unión a través de etiqueta de histidina con chips de NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de moléculas que comprenden regiones Fc variantes, por ejemplo, inmunoglobulinas que comprenden la región Fc variante, a un FcγR pueden determinarse usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Puede usarse cualquier FcγR para evaluar la interacción con las moléculas que comprenden regiones Fc variantes. En una realización específica, el FcγR es FcγRIIIA, preferiblemente un FcγRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia unida a la secuencia de ligador-AVITAG (véase, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/439.498, presentada el 9 de enero de 2003 (expediente del apoderado n.º 11183-004-888) y la solicitud provisional estadounidense n.º 60/456.041 presentada el 19 de marzo de 2003). En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, preferiblemente un FcγRIIB quimérico soluble. Por ejemplo, en una realización, la proteína FcγRIIB dimérica soluble se prepara según la metodología descrita en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/439.709 presentada el 13 de enero de 2003.

Un ensayo a modo de ejemplo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende una región Fc variante, en el que la molécula es el anticuerpo 4-4-20, frente a un FcγR usando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: Se inmoviliza BSA-FITC sobre una de las cuatro células de flujo de la superficie de un chip sensor, preferiblemente a través de química de acoplamiento de amina de modo que se inmovilizan aproximadamente 5000 unidades de respuesta (UR) de BSA-FITC sobre la superficie. Una vez preparada una superficie adecuada, se hacen pasar anticuerpos 4-4-20 que portan las mutaciones de Fc sobre la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una disolución 20 µg/ml a una velocidad de flujo de 5 µl/ml. El nivel de anticuerpos 4-4-20 unidos a la superficie oscila entre 400 y 700 UR. A continuación, se inyectan series de dilución del receptor (FcγRIIA y proteína de fusión de FcγRIIB-Fc) en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5) sobre la superficie a 100 µl/min. Se lleva a cabo la regeneración de anticuerpos entre diferentes diluciones de receptor preferiblemente mediante inyecciones de 5 segundos individuales de NaHCO₃ 100 mM pH 9,4; NaCl 3 M. En el método del presente documento se contempla cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica.

Una vez se recoge un conjunto de datos completo, se ajustan globalmente las curvas de unión resultantes usando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante de instrumentos de SPR, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la K_{aso} como la K_{dis} , a partir de las cuales se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D , como la razón de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{dis}/K_{aso}). Pueden encontrarse tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el manual de software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados puede realizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszk, 1997, *Current Opinion in Biotechnology* 8: 50-7; Fisher *et al.*, 1994, *Current Opinion in Biotechnology* 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, *Current Opinion in Biotechnology*, 5:65-71; Chaiken *et al.*, 1992, *Analytical Biochemistry*, 201: 197-210; Morton *et al.*, 1995, *Analytical Biochemistry* 227: 176-85; O'Shannessy *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83.

En realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden usarse como medida predictiva de cómo funcionará una molécula en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método a modo de ejemplo para predecir la eficacia de una molécula basándose en parámetros cinéticos obtenidos de un análisis de SPR pueden comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{dis} para la unión de una molécula a FcγRIIIA y FcγRIIB; representar gráficamente (1) $K_{dis}(wt)/K_{dis}(\text{mutante})$ para FcγRIIIA; (2) $K_{dis}(\text{mutante})/K_{dis}(wt)$ para FcγRIIB frente a los datos de ADCC. Los números mayores de uno muestran una tasa de disociación disminuida para FcγRIIIA y una tasa de disociación aumentada para FcγRIIB en relación con el tipo natural; y poseen una función de ADCC potenciada.

6.3 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE MANERA RECOMBINANTE DE LAS MOLÉCULAS DESCRITAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

6.3.1 POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN PARA LAS MOLÉCULAS DESCRITAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

También se describen polinucleótidos que codifican para las moléculas, incluyendo los polipéptidos y anticuerpos, identificados mediante los métodos en el presente documento. Los polinucleótidos que codifican para las moléculas pueden obtenerse, y puede determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos de las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) que se identifican mediante los métodos en el presente documento, la secuencia de nucleótidos puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo generando sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, cuando los ácidos nucleicos codifican para anticuerpos, se inserta una o más de las CDR dentro de las regiones de entramado usando técnicas de ADN recombinante de rutina. Las regiones de entramado pueden ser regiones de entramado que se producen de manera natural o consenso, y son preferiblemente regiones de entramado humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para una lista de las regiones de entramado humanas).

En otra realización, pueden examinarse bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica, mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican para las moléculas descritas en el presente documento.

6.3.2 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS MOLÉCULAS DESCRITAS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica para las moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos), puede producirse el vector para la producción de las moléculas mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes para las moléculas y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel *et al.* eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Puede transferirse un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada mediante los métodos en el presente documento (es decir, un anticuerpo) a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y entonces se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir las moléculas. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas está regulada por un promotor específico constitutivo, inducible o tisular.

Las células huésped usadas para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento pueden ser o bien células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el principal elemento promotor génico temprano intermedio del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking *et al.*, 1998, Gene 45:101; Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2).

Puede utilizarse una variedad de los sistemas de expresión de vector en el huésped para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento. Tales sistemas de expresión en el huésped representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de las moléculas y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden expresar, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, las moléculas *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes para las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias que codifican para las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican para las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican para las moléculas identificadas mediante los métodos en el presente documento; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfóticas (véase el documento estadounidense 5.807.715), células Per C.6 (células de la retina humana desarrolladas por Crucell) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula que está expresándose. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de una proteína de este tipo, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos proteicos de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la

región codificante de *lac Z*, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acid Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (ACNP) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente dentro de regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, la secuencia promotora tardía y líder tripartita. Entonces puede insertarse este gen quimérico en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). Las señales de iniciación específicas también puede requerir la traducción eficaz de secuencias codificantes del anticuerpo insertado. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción del inserto completo. Estas señales de control y codones de iniciación exógenos de la traducción pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos apropiados potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner *et al*, Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Además, puede elegirse una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares y sistemas de huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, glicosilación y fosforilación del producto génico. Estas células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse células huésped con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, puede dejarse que crezcan las células modificadas por ingeniería genética durante 1-2 días en un medio enriquecido y entonces se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse dando lugar a líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan los anticuerpos. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en el examen y la evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con los anticuerpos.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11: 223), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22: 817), que pueden emplearse en células tk-, hgprrt- o aprt-, respectivamente. También puede usarse la resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; mayo de 1993, TIB TECH 11(5): 155-215). Métodos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), 1994,

Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1; e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147).

Los niveles de expresión de un anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, volumen 3 (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando puede amplificarse un marcador en el sistema del vector que expresa un anticuerpo, un aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de células huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión descritos en el presente documento, codificando el primer vector para un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para un polipéptido de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un solo vector que codifica para ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera puede colocarse antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha expresado de manera recombinante una molécula descrita en el presente documento (es decir, anticuerpos), puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos o anticuerpos, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico tras proteína A, y en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos o anticuerpos.

6.4 MÉTODOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

También se describe la administración de una o más de las moléculas descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos) a un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano, para la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas descritas en el presente documento son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en donde se desea una eficacia potenciada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedad neoplásica primaria o metastásica (es decir, cáncer), y enfermedades infecciosas. Las moléculas descritas en el presente documento pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se conoce en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Tal como se detalla a continuación, las moléculas descritas en el presente documento pueden usarse en métodos de tratamiento o prevención de cáncer (particularmente en inmunoterapia pasiva), enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas.

Las moléculas descritas en el presente documento también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o la prevención de un cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 y IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interaccionan con las moléculas y, aumentan la respuesta inmunitaria. Las moléculas descritas en el presente documento también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, por ejemplo, tal como se detalla en las secciones 6.4.1.2 y 6.4.2.1 a continuación.

6.4.1 CÁNCERES

También se describen métodos y una composición para el tratamiento o la prevención de cáncer o metástasis en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden una región Fc variante.

Las moléculas descritas en el presente documento (es decir, polipéptidos, anticuerpos) que comprenden regiones Fc variantes pueden usarse para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o metástasis de células cancerosas. En una realización, la molécula descrita en el presente documento comprende una variante Fc que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas pueden usarse solas para tratar o prevenir el cáncer. En otra realización, la molécula descrita en el presente documento comprende una región Fc variante que

se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una afinidad mayor que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA, y se une adicionalmente a FcγRIIB con una afinidad menor que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a FcγRIIB, y/o dicha región Fc variante tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas también pueden usarse solas para tatar o prevenir el cáncer.

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención de cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR tales como los homocigotos para los alelos FcγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor según los métodos descritos en el presente documento, de modo que los anticuerpos modificados por ingeniería genética tienen eficacia potenciada en pacientes homocigotos para el alelo de baja afinidad de FcγRIIIA (158F). También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor según los métodos descritos en el presente documento de modo que los anticuerpos modificados por ingeniería genética tienen eficacia potenciada en pacientes homocigotos para el alelo de alta afinidad de FcγRIIIA (158V).

En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento son particularmente eficaces en el tratamiento y/o la prevención del linfoma no Hodgkin (NHL). Los anticuerpos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento son terapéuticamente más eficaces que los regímenes terapéuticos actuales para NHL, incluyendo pero sin limitarse a quimioterapia e inmunoterapia usando el AcM anti-CD20, Rituximab. Sin embargo, la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 depende del polimorfismo de FcγR del sujeto (Carton *et al.*, 2002 Blood, 99: 754-8; Weng *et al.*, 2003 J Clin Oncol.21(21):3940-7). Estos receptores se expresan sobre la superficie de las células efectoras y median ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores activantes de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar en ADCC. Los métodos descritos en el presente documento permiten modificar por ingeniería genética anticuerpos anti-CD20 que albergan mutaciones de Fc para potenciar su afinidad para FcγR en células efectoras a través de sus dominios Fc alterados. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Un método a modo de ejemplo para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-CD20 modificados por ingeniería genética en un sujeto puede incluir lo siguiente: Pueden usarse plásmidos que albergan genes de cadena pesada de anticuerpo anti-HER2/neu con mutaciones de Fc que muestran sustancialmente destrucción aumentada en ADCC como estructura principal para transferir al dominio variable desde el gen de cadena pesada de Rituximab. La región variable de la variante de Fc anti-HER2/neu se reemplaza por la región variable de Rituximab. Se cotransfectan de manera transitoria plásmidos que contienen los dominios Fc de tipo natural o una mutación D265A para suprimir la unión a FcR, o se cotransfectan de manera transitoria las variantes de Fc anti-CD20 con el gen de cadena ligera de Rituximab en células 293H, medio acondicionado y el anticuerpo se purifica sobre una columna de proteína G usando métodos de rutina.

Se someten a prueba AcM anti-CD20 que albergan las variantes de Fc mediante ADCC usando una línea de células B cultivada para determinar la capacidad de las mutaciones de Fc para potenciar ADCC. Se realiza ADCC convencional usando métodos dados a conocer en el presente documento. Se recogen los linfocitos de la sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Se cargan células Daudi diana, una línea de células B que expresa CD20, con europio (PerkinElmer) y se incuban con efectores durante 4 h a 37°C. Se detecta el europio liberado usando un lector de placa fluorescente (Wallac). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las variantes de Fc para desencadenar citotoxicidad mediada por células NK y establecen qué variantes de Fc anti-CD20 pueden someterse a prueba tanto con muestras de pacientes como con monocitos sometidos a elutriación. Las variantes de Fc que muestran el mayor potencial para potenciar la eficacia del anticuerpo anti-CD20 se someten entonces a prueba en un ensayo de ADCC usando PBMC de pacientes. Se usan PBMC de donantes sanos como células efectoras. Se realizan ensayos de ADCC *in vitro* usando variantes anti-CD20 y Rituximab en células de linfoma primario de pacientes con linfoma folicular. Se determina el polimorfismo de FcγR específico de los donantes y se cataloga usando métodos conocidos en la técnica. El ensayo de ADCC se realiza mediante células efectoras de pacientes con diferentes genotipos de FcγRIIIA y FcγRIIA.

Las moléculas (por ejemplo, anticuerpos) descritas en el presente documento que comprenden regiones Fc variantes pueden potenciar la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer aumentando la potencia de la función efectora del anticuerpo en relación con una molécula que contiene la región Fc de tipo natural, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. En una realización específica, se potencia la toxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o la fagocitosis de células tumorales usando las moléculas descritas en el presente documento con regiones Fc variantes. Las moléculas descritas en el presente documento pueden potenciar la eficacia del tratamiento del cáncer con inmunoterapia potenciando al menos una función efectora mediada por anticuerpo. En una realización particular, una molécula descrita en el presente documento que comprende una región Fc variante potencia la eficacia del tratamiento con inmunoterapia potenciando la cascada dependiente de complemento. La molécula descrita en el presente documento que comprende una región Fc variante puede potenciar la eficacia del

tratamiento con inmunoterapia potenciando la fagocitosis y/u opsonización de las células tumorales seleccionadas como diana. La molécula descrita en el presente documento que comprende una región Fc variante puede potenciar la eficacia del tratamiento potenciando citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales seleccionadas como diana.

También se describe la modificación por ingeniería genética de anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) para potenciar la eficacia terapéutica del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, potenciando la función efectora del anticuerpo terapéutico (por ejemplo, ADCC). Preferiblemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo citotóxico y/o de opsonización. Un experto en la técnica apreciará que una vez que se han identificado las moléculas descritas en el presente documento con propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácido, modificación que potencia la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc de tipo natural) (véase la sección 6.2 y la tabla 9) según los métodos descritos en el presente documento, pueden modificarse por ingeniería genética anticuerpos terapéuticos usando técnicas de ADN recombinante convencionales y cualquier técnica de mutagénesis conocida, tal como se describe en la sección 6.2.2 para producir un agente terapéutico modificado por ingeniería genética que porta los sitios de mutación identificados con las propiedades de unión deseadas. Cualquiera de los anticuerpos terapéuticos enumerados en la tabla 10 que tienen utilidad terapéutica demostrada en el tratamiento del cáncer, puede modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, modificando la región Fc para tener una afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en comparación con un anticuerpo terapéutico que tiene una región Fc de tipo natural, y usarse para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer. Otros anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos contra agentes patógenos tales como aquellos contra el serotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*, véase, por ejemplo, Sun *et al.*, 1999, *Infection and Immunity*, 67(3): 1172-9.

Las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden incorporarse en anticuerpos terapéuticos tales como los descritos en el presente documento u otros candidatos clínicos de fusión de Fc, es decir, una molécula que comprende unas regiones Fc que se han aprobado para su uso en ensayos clínicos o cualquier otra molécula que pueda beneficiarse de las variantes de Fc descritas en el presente documento, versiones humanizadas, maduras por afinidad, modificadas u obtenidas mediante ingeniería genética de las mismas.

También se describe la modificación por ingeniería genética de cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc que tiene utilidad terapéutica, incluyendo pero sin limitarse a ENBREL, según los métodos descritos en el presente documento, con el fin de potenciar la eficacia terapéutica de tales polipéptidos, por ejemplo, potenciando la función efectora del polipéptido que comprende una región Fc.

Tabla 10. Anticuerpos terapéuticos que pueden modificarse por ingeniería genética según los métodos descritos en el presente documento

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF™	cáncer	Receptor de EGF
AltaRex	OvaRex™	cáncer de ovario	Antígeno tumoral CA125
	BravaRex™	cánceres metastásicos	Antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn™ (pemtumomab-itrío-90)	cáncer de ovario	Antígeno PEM
	Therex™	cáncer de mama	Antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex™	cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro™	PTCA	gp IIb/IIIa
	ReoPro™	IM agudo	gp IIb/IIIa
	ReoPro™	accidente cerebrovascular isquémico	gp IIb/IIIa
Corixa	Bexocar™	NHL	CD20

CRC Technology	AcM, 105AD7 idiotípico	vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	AcM, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptin®	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptin®	cáncer de mama de estadio temprano	HER-2
	Rituxan®	con recidiva/que no responde al tratamiento	CD20
		NHL de grado bajo o folicular	
	Rituxan®	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	AcM-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	AcM-VEGF	cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	AMD™ Fab	degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26™ (IgE, 2ª gen.)	asma alérgica y rinitis	IgE
IDEC	Zevalin™ (Rituxan™ + itrio- 90)	NHL de células B, de grado bajo o folicular, con recidiva o que no responde al tratamiento, positivo para CD20 y NHL que no responde al tratamiento con rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab™ + irinotecán	carcinoma colorrectal que no responde al tratamiento	Receptor de EGF
	Cetuximab™ + cisplatino y radiación	cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente	Receptor de EGF
	Cetuximab™ + gemcitabina	carcinoma pancreático metastásico recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab™ + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	Receptor de EGF
	Cetuximab™ + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab™ + cisplatino™	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional incurable extendida y metástasis distantes)	Receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado	Receptor de EGF
	BEC2 + bacilo Calmette Guérin	carcinoma de pulmón de células pequeñas	Imita al gangliósido GD3
	BEC2 + bacilo Calmette Guérin	melanoma	Imita al gangliósido GD3
	IMC-1C11	cáncer colorrectal con metástasis de hígado	Receptor de VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
		cáncer	
ImmunoMedics	LymphoCide™	linfoma no Hodgkins	CD22
	LymphoCide Y-	linfoma no Hodgkins	CD22

	⁹⁰ Tm		
	CEA-Cide™	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90™	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan™ (arcitumomab marcado con Tc- 99m)	cáncer colorrectal (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan™ (arcitumomab marcado con Tc- 99m)	cáncer de mama (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan™ (arcitumomab marcado con Tc- 99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan™ (arcitumomab marcado con Tc- 99m)	tumores intraoperatorios (radioimagen)	CEA
	LeukoScan™ (sulesomab marcado con Tc- 99m)	infección de tejidos blandos (radioimagen)	CEA
	LymphoScan™ (marcado con Tc- 99m)	linfomas (radioimagen)	CD22
	AFP-Scan™ (marcado con Tc- 99m)	cánceres de células germinales y de hígado (radioimagen)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	obtención de imágenes colorrectales	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA- 4)	cáncer de próstata y otros	CTLA-4
	MDX-210 (sobrexpresión de her-2)	cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin™	Cáncer	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	AcM 425	Diversos cánceres	receptor de EGF
	IS-IL-2	Diversos cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath® (alemtuzumab)	Leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20- estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	linfoma no Hodgkins	CD20
	Avidicina (albúmina NRLU13) +	cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym™ (+ yodo-131)	linfoma no Hodgkins	HLA-DR 10 beta

	Cotara™ (+ yodo-131)	inoperable	proteínas asociadas a ADN
		glioma maligno	
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica)	cáncer pancreático	NA
	AcM, cáncer de pulmón/riñón	cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolumab tafenatox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer pancreático y de colon	NA
Protein Design Labs	Nuvion™	tumores malignos de células T	CD3
	SMART M195™	AML	CD33
	SMART 1D10™	NHL	Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac™	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem™	melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	Gangliósido GD2
	TriAb™	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVa™c	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem™	melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	Gangliósido GD2
	TriAb™	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado	linfoma no Hodgkins	NA
	Monopharm C™	carcinoma colorrectal y pancreático	Antígeno SK-1
	GlioMAb-H™ (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan™	NHL de grado bajo o folicular con recidiva/que no responde al tratamiento	CD20
	Rituxan™	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

Por consiguiente, la descripción proporciona métodos de prevención o tratamiento del cáncer caracterizados por un antígeno de cáncer, usando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico y se ha modificado en uno o más sitios en la región Fc, según la descripción en el presente documento, para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que el anticuerpo terapéutico parental, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) más eficazmente. También se describen métodos de prevención o tratamiento del cáncer caracterizados por un antígeno de cáncer, usando un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico, y se ha modificado por ingeniería genética según la descripción en el presente documento para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad y se une a FcγRIIB con una afinidad menor que el anticuerpo terapéutico parental, y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) más eficazmente. Los anticuerpos terapéuticos que se han modificado por ingeniería genética según la descripción en el presente documento son útiles para la prevención o el tratamiento de cáncer, puesto que tienen una actividad citotóxica potenciada (por ejemplo, destrucción potenciada de células tumorales y/o por ejemplo, actividad de ADCC o actividad de CDC potenciada).

Los cánceres asociados con un antígeno de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno de cáncer y es citotóxico, y se ha modificado por ingeniería genética según los métodos descritos en el presente documento para tener, por ejemplo, una función efectora

- potenciada. En una realización particular, los anticuerpos terapéuticos modificados por ingeniería genética según los métodos descritos en el presente documento potencian el efecto citotóxico mediado por anticuerpos del anticuerpo dirigido al antígeno de cáncer particular. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, pueden tratarse o prevenirse los cánceres asociados con los siguientes antígenos de cáncer mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento: antígeno KS 1/4 del pancarcinoma (Perez y Walquer, 1990, *J. Immunol.* 142:32-37; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4):407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51(2):48-475), fosfato de ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(1):4928), antígeno específico de la próstata (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53:227-230), antígeno p97 asociado con melanoma (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6):445-44), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer* 59:55-3; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13:294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno 38.13 del linfoma de Burkitt, CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood* 83:1329-1336), antígeno CD20 del linfoma B humano (Reff *et al.*, 1994, *Blood* 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.* 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53:5244-5250), antígeno de la superficie celular de tipo de trasplantes específicos de tumores (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus incluyendo el antígeno T de virus tumorales de ADN y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, alfa-fetoproteína antigénica oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno L6, L20 de carcinoma de pulmón humano (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de células T de la leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. de Immun.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno del cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), antígeno linfocítico humano maligno APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, *Science* 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I (Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrado en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D₁₅₆₋₂₂ encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrada en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor de EGF (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T_{5A7} encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones de fase celular 4-8. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado de receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).
- Cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Leucemias incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblástica, promielocítica, mielonomocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como pero sin limitarse a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, policitemia vera; linfomas tales como pero sin limitarse a enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como pero sin limitarse a mieloma múltiple indolente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas de tejido óseo y conjuntivo tales como pero sin limitarse a sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de huesos, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo pero sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como pero sin limitarse a cáncer de tiroides papilar o folicular; cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, incluyendo pero sin limitarse a, insulinooma, gastrinooma, glucagonoma, vipoma, somatostatinooma, y tumor carcinoide o insulinooma;

cánceres hipofisarios incluyendo pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, prolactinoma, acromegalia, y diabetes insípida; cánceres oculares incluyendo pero sin limitarse a, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma coroidal y melanoma de cuerpos ciliares, y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de epitelio de ovario, tumor de escasa malignidad, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos incluyendo pero sin limitarse a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células pequeñas; cánceres de estómago incluyendo pero sin limitarse a, adenocarcinoma, linfoma maligno fungoide (polipoide), ulcerante, de diseminación superficial, que se disemina difusamente, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos incluyendo pero sin limitarse a carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo pero sin limitarse a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón incluyendo pero sin limitarse a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares incluyendo pero sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, carcinoma anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminomatoso, embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo pero sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rhabdomyosarcoma; cánceres de pene; cánceres bucales incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivares incluyendo pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe incluyendo pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de células basales, melanoma y carcinoma de células escamosas, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acro; cánceres renales incluyendo pero sin limitarse a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (de pelvis renal y/ o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga incluyendo pero sin limitarse a, carcinoma de célula de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2ª ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy *et al.*, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, los métodos y composiciones descritos en el presente documento también son útiles en el tratamiento o la prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anómalas, incluyendo (pero sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cuello uterino, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres producidos por aberraciones en apoptosis también se tratarían mediante las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan a linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los tumores malignos o los cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o los trastornos hiperproliferativos, se tratan o se previenen mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento en ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, se trata o se previene el sarcoma, melanoma o la leucemia mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

En una realización específica, una molécula descrita en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante, o un anticuerpo terapéutico monoclonal modificado por ingeniería genética según los métodos de la invención) inhibe o reduce el crecimiento del tumor primario o la metástasis de células cancerosas en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% en relación con el crecimiento del tumor primario o la metástasis en ausencia de dicha molécula descrita en el presente documento.

6.4.1.1 TERAPIA DE COMBINACIÓN

También se describe administrar las moléculas descritas en el presente documento en combinación con otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o la prevención de cáncer, incluyendo pero sin limitarse a, quimioterapias convencionales y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes anticancerígenos, anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos enumerados en la tabla 10), u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de cáncer (véase la sección 6.4.1.2).

En determinadas realizaciones, se administra una o más moléculas descritas en el presente documento a un mamífero, preferiblemente un ser humano, simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien quiere decir que una molécula descrita en el presente documento y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo que la molécula descrita en el presente documento puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio aumentado que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía apropiada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, aproximadamente con 1 hora de diferencia, con de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, dos o más componentes se administran dentro de la misma visita del paciente.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con aproximadamente de 2 a 4 días de diferencia, con aproximadamente de 4 a 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con aproximadamente de 1 a 2 semanas de diferencia, o más de 2 semanas de diferencia. En realizaciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un intervalo de tiempo en el que ambos agentes están todavía activos. Un experto en la técnica podría determinar tal intervalo de tiempo determinando la semivida de los agentes administrados.

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia de ciclación implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial. La terapia de ciclación puede reducir el desarrollo de la resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

En determinadas realizaciones, se administran agentes profilácticos o terapéuticos en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez a la semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico mediante infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 12 ciclos, más normalmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 ciclos, y más normalmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 ciclos.

En aún otras realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos en el presente documento se administran en regímenes de dosificación metronómica, o bien mediante infusión continua o bien administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar dosificación a intervalos constantes sin periodos de descanso. Normalmente los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se usan a dosis menores. Tales regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante periodos de tiempo prolongados. En realizaciones preferidas, el uso de dosis menores puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran mediante infusión continua o crónica a dosis baja que oscila entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses,

aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses. La planificación de tales regímenes de dosificación puede optimizarse por el oncólogo experto.

En otras realizaciones, se administran ciclos de tratamiento simultáneamente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los agentes terapéuticos por separado y aún dentro de un intervalo de tiempo de modo que las moléculas descritas en el presente documento pueden funcionar junto con el otro agente o agentes. Por ejemplo, puede administrarse un componente una vez a la semana en combinación con los otros componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación para los agentes terapéuticos pueden llevarse a cabo simultáneamente aunque los agentes terapéuticos no se administren simultáneamente o dentro de la misma visita del paciente.

Cuando se usan en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas descritas en el presente documento y los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden actuar de manera aditiva o, más preferiblemente, de manera sinérgica. En una realización, una molécula descrita en el presente documento se administra simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. En otra realización, una molécula descrita en el presente documento se administra simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas separadas. En todavía otra realización, una molécula descrita en el presente documento se administra antes o posteriormente a la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. La descripción contempla la administración de una molécula descrita en el presente documento en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos mediante vías de administración iguales o diferentes, por ejemplo, oral y parenteral. En determinadas realizaciones, cuando una molécula descrita en el presente documento se administra simultáneamente con otro agente profiláctico o terapéutico que produce potencialmente efectos secundarios adversos incluyendo, pero sin limitarse a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que se encuentra por debajo del umbral al que se provoca el efecto secundario adverso.

Las cantidades y frecuencias de dosificación de administración proporcionadas en el presente documento están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y frecuencia normalmente variarán adicionalmente según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos especificados administrados, de la gravedad y del tipo de cáncer, de la vía de administración, así como de la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia médica pasada del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por un experto en la técnica considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones notificadas en la bibliografía y recomendadas en la Physician's Desk Reference (56^a ed., 2002).

6.4.1.2 OTROS AGENTES TERAPÉUTICOS/PROFILÁCTICOS

En una realización específica, los métodos descritos en el presente documento abarcan la administración de una o más moléculas descritas en el presente documento con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. En una realización, pueden administrarse inhibidores de angiogénesis en combinación con las moléculas descritas en el presente documento. Los inhibidores de angiogénesis que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen pero no se limitan a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; angiocima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartilago (CDI); CAI; fragmento de complemento de CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacarídico de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteinasas (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); AcM IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador de plasminógeno; factor 4 de plaquetas (PF4); prinomastat; fragmento de prolactina de 16 kD; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahydrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; trombospondina 1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); vasculoestatina; vasoestatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerígenos que pueden usarse en combinación con las moléculas descritas en el presente documento en diversas realizaciones, incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits descritos en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adocelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexamaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato;

clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatio; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiaurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluyendo interleucina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-nl ; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatio; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparomicina; clorhidrato de espirogermanina; epiromustina; espiroplatio; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalano sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatio; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros fármacos anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética antidorsalizante, antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrona; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilsperrina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina-sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camoptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinolaxina-sulfonamida; cicaprost; cisporfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatamo; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; desloreline; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziouona; didemina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrona; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitetur; epirubicina; epristerida; análogo de la estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio-texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfamo; heregulina; hexametilbisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastato; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplactol; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrona; jasplakinolida; kahalalida F; N-triacetrato de lamellarina; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliaminas lineales; péptido disacarídico lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; loboplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecano; lutetio-texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrisilina; inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor del MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario con apareamiento erróneo; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina-factor de crecimiento del fibroblastos-sapronina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; lípido monofosforílico A + sk de pared celular de miobacterias; mopidamol; inhibidor de gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor de tumores múltiples 1; agente anticancerígeno de mostaza; micaperoxido B; extracto de pared celular de micobacterias; miraporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafareline; nagrestip; naloxona + pentazocina; navapina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; nitrullina; O6-bencilguanina; ocreótida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de

- paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelitina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato sódico de pentosano; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de la proteasoma; modulador inmunitario basado en proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado de hemoglobina-polioxiétileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitucina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; sarCNU; sarcotitol A; sargramostim; miméticos del Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatrina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; suainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metiyoduro de tamoxiveno; tauromustina; tazaroteno; tecogalano sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoietina; timalfasina; agonista del receptor de timopoietina; timotrinano; hormona estimulante de tiroides; etil-etipurpurina de estaño; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de la tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno genitourinario; antagonistas del receptor de urocinasa; vaporetida; variolina B; sistema de vector, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina. Fármacos anticancerígenos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.
- Ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento incluyen pero no se limitan a ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado, inmunosupresor para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a anti-antígeno de la superficie celular 17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG murino anti-idiotipo (epítipo de GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG quimérico anti-EGFR (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha V\beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD33 (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD22 (Immunomedics); ICM3 que es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG humanizada anti-CD3 (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo humanizado anti-factor 5 del complemento (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab humanizado anti-TNF- α (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 primatizado anti-CD4 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG humano anti-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 humanizado anti-TNF- α (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4\beta 7$ (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD4 (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD40L (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-VLA-4 (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF- $\beta 2$ (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse según la descripción se presentan en la tabla 10.

6.4.2 ENFERMEDAD AUTOINMUNITARIA Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

- En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA. Las moléculas descritas en el presente documento con tales características de unión son útiles en regular la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en inhibir la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. Aunque sin pretender restringirse a ningún mecanismo de acción, las moléculas descritas en el presente documento con una afinidad potenciada por Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA pueden conducir a amortiguar la respuesta activante a Fc γ R y la inhibición de la receptividad celular.

- En algunas realizaciones, una molécula descrita en el presente documento que comprende una región Fc variante no es una inmunoglobulina, y comprende al menos una modificación de aminoácido, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo

natural. En otras realizaciones, dicha molécula comprende además una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que disminuyen la afinidad de la molécula por un FcγR activante. En algunas realizaciones, la molécula es una región Fc soluble (es decir, no unida a membrana). La descripción contempla otras modificaciones de aminoácidos dentro de la región Fc soluble que modula su afinidad por diversos receptores de Fc, incluyendo los conocidos por un experto en la técnica tal como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la molécula (por ejemplo, la región Fc que comprende al menos una o más modificaciones de aminoácido) se modifica usando técnicas conocidas por un experto en la técnica y tal como se describe en el presente documento para aumentar la semivida *in vivo* de la región Fc. Tales moléculas tienen utilidad terapéutica en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno autoinmunitario. Aunque sin pretender restringirse a ningún mecanismo de acción, tales moléculas con afinidad potenciada por FcγRIIB conducirán a una amortiguación de los receptores activantes y por tanto a la amortiguación de la respuesta inmunitaria y tendrán eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmunitario.

En determinadas realizaciones, la una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina. En una realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 247 con leucina. En otra realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 372 con tirosina. En aún otra realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico. En una realización, la una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA comprenden una sustitución en la posición 224 con leucina.

Las regiones Fc variantes que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural, pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. También se describen métodos de prevención, tratamiento o gestión de uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio en un sujeto, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento con regiones Fc variantes que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y o FcγRIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural.

También se describen métodos para prevenir, tratar o gestionar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprenden además, administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen métodos para prevenir, tratar o gestionar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmunitaria que comprenden además, administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 6.4.2.1 proporciona ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse mediante la administración de las moléculas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, orquitis y ooforitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome por disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, pénfigo cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las crioglobulinas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromilagia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitométrica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndrome poliglandular, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tal como vasculitis por dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC),

trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica que resulta de infecciones víricas o bacterianas crónicas. Tal como se describe en el presente documento en la sección 3.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios están asociados con un estado inflamatorio. Por tanto, hay solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por tanto, algunos trastornos autoinmunitarios también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o gestionarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica que resulta de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Las moléculas descritas en el presente documento con regiones Fc variantes que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural también pueden usarse para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula descrita en el presente documento reduce la inflamación en un animal en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% en relación con la inflamación en un animal, al que no se le administra dicha molécula.

Las moléculas descritas en el presente documento con regiones Fc variantes que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural también pueden usarse para prevenir el rechazo de trasplantes.

También se describe la modificación por ingeniería genética de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria, de modo que los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que se ha identificado mediante los métodos descritos en el presente documento que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que pueden modificarse por ingeniería genética según la descripción se presenta en la tabla 11, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la tabla 12.

Tabla 11: Anticuerpos para enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias que pueden modificarse por ingeniería genética según la descripción.

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Promotores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio

Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectina	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Factor VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Accidente cerebrovascular
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubish i	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/GlaxoSmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/Alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium (LeukoSite Inc.) Inc	Accidente cerebrovascular
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium (LeukoSite Inc.) Inc	Rechazo de aloinjerto
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium (LeukoSite Inc.) Inc	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centocor	Trastornos hematológicos autoinmunitarios
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
Orthoclone/ anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
RepPro/ Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox	Asma/Alergia
				Biosystems	

SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKlin e	Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKlin e	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Scherin g	Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

Tabla 12: Anticuerpos para trastornos autoinmunitarios que pueden modificarse por ingeniería genética según la descripción

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo frente a antígeno CBL en células T, células B y células NK, anticuerpo completamente humano a partir de Xenomouse
5c8 (anticuerpo anti ligando de CD-40)	Los ensayos de fase II se detuvieron en octubre. 99 examinar "acontecimientos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti-CD40, humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado ; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	primatizado anti-CD80
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (AcM anti-b7)	enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
SMART, anticuerpo anti-interferón gamma	trastornos autoinmunitarios	Anti-interferón gamma
Verteporfina	artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos sanguíneos producidos por reacciones autoinmunitarias, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), anemia hemolítica autoinmunitaria	anticuerpo monoclonal contra receptores FcRI
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otra autoinmunidad	anticuerpo monoclonal contra molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunitarios, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus, psoriasis	inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para obtener nuevo ARN y ADN usados en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)

VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina-1 beta (la enzima convertidora controla las rutas que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva)
VX-745	Específico para la inflamación implicada en la señalización química del comienzo de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	Inhibidor de P38MAP, proteína cinasa activada por mitógeno
Enbrel (etanercept)		dianas TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		anticuerpo monoclonal humano completo contra IL-8 (interleucina 8)
Apogen MP4		el antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas con enfermedad, induce apoptosis, las células T eliminadas por muerte celular programada ya no atacan a las propias células del organismo, células T específicas de diana antigénica específica

6.4.2.1 AGENTES INMUNOMODULADORES Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

- También se describen métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas con regiones Fc variantes que tienen una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA conjuntamente con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolímús)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolímús), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitrilamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de células T y moduladores del receptor de citocina.

Los agentes antiinflamatorios han demostrado ser satisfactorios en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios y constituyen ahora un tratamiento común y convencional para tales trastornos. Cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

6.4.3 ENFERMEDAD INFECCIOSA

También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por las moléculas descritas en el presente documento están provocadas por agentes infecciosos incluyendo pero sin limitarse a virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas descritas en el presente documento conjuntamente con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las provocadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (VHS-I), herpes simple tipo II (VHS-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus de coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II), y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas descritas en el presente documento conjuntamente con los métodos descritos en el presente documento, que están provocadas por bacterias, incluyen, pero no se limitan a, micobacterias *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (carbunco), tétanos, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, tétanos, tosferina, cólera, peste, difteria, *Chlamydia*, *S. aureus* y *Legionella*.

Las enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas descritas en el presente documento conjuntamente con los métodos descritos en el presente documento, que están provocadas por protozoos, incluyen, pero no se limitan a, *Leishmania*, *Kokzidia*, *Trypanosoma* o malaria.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas descritas en el presente documento conjuntamente con los métodos descritos en el presente documento, que están provocadas por parásitos, incluyen, pero no se limitan a, *Chlamydia* y *Rickettsia*.

Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden regiones Fc variantes pueden tener una función efectora de anticuerpos potenciada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. Los ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecialis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*), un patógeno (por ejemplo, papovavirus linfotrófico B (PVL); *Bordetella pertussis*; virus de la enfermedad de Borna (VEB); coronavirus bovino; virus de la coriomeningitis; virus del dengue; un virus, *E. coli*; Ébola; ecovirus 1; ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacterias entéricas; virus huérfano entérico; enterovirus; virus de la leucemia felina; virus de la enfermedad de pie y boca; virus de la leucemia del mono gibón (VLMG); bacterias Gram-negativas; *Helicobacter pylori*; virus de la hepatitis B (VHB); virus del herpes simple; VIH-1; citomegalovirus humano; coronavirus humano; influenza A, B y C; *Legionella*; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; virus del sarampión; *Meningococcus*; morbillivirus; virus de la hepatitis del ratón; virus de la leucemia murina; virus del herpes gamma murino; retrovirus murino; coronavirus murino, virus de la hepatitis del ratón; *Mycobacterium avium-M*; *Neisseria gonorrhoeae*; virus de la enfermedad de Newcastle; parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; virus de la viruela; *Pseudomonas*; rotavirus; *Samonella typhurium*; *Shigella*; estreptococos; virus linfotrópico de células T 1; virus vaccinia).

Las moléculas descritas en el presente documento pueden potenciar la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa potenciando la fagocitosis y/o opsonización del agente infeccioso que provoca la enfermedad infecciosa. En otra realización específica, las moléculas descritas en el presente documento potencian la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa potenciando la ADCC de células infectadas que provocan la enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un agente terapéutico o agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas descritas en el presente documento en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozilo (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMicina®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacino (Floxin®), ciprofloxacino (Cipro®) o norfloxacino (Noroxin®)), antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomomicina), antibióticos de amfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloramfenicol, florfenicol y tiamfenicol), antibióticos de ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefemos (por ejemplo, loracarbef), carbapenemos (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftiozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefemos (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina de sodio, epicilina, fenbencilina, floxacilina, penamecilina, yodhidrato de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilina y feneticilina de potasio), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprima), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de las mismas (por ejemplo, cinoxacino, clinafloxacino, flumequina y grepafloxacino), sulfonamidas (por ejemplo, acetilsulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalil-sulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona de sodio y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

En determinadas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Los agentes antifúngicos que pueden usarse en combinación con las moléculas descritas en el presente documento incluyen pero no se limitan a anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulvina.

En algunas realizaciones, las moléculas descritas en el presente documento pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales útiles que pueden usarse en combinación con las moléculas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos y análogos de nucleósidos. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen pero no se limitan a zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevudina, entecavir, pleconarilo.

6.5 TERAPIA DE VACUNA

También se describe el uso de una composición descrita en el presente documento para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, incluyendo pero sin limitarse antígenos de cáncer y antígenos de enfermedad infecciosa (ejemplos de los cuales se dan a conocer a continuación). Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria, en las que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos se recubren con un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene una afinidad potenciada por Fc γ R11A. Aunque no se pretende restringirse a un mecanismo de acción particular, el recubrimiento de un agente antigénico o inmunogénico con un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene una afinidad potenciada por Fc γ R11A potencia la respuesta inmunitaria frente al agente antigénico o inmunogénico deseado induciendo respuestas humorales o mediadas por células. Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento son particularmente eficaces provocando una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos, y están preferiblemente atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede realizarse usando métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica. También se describe una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada que va a formularse según la descripción en el presente documento. Puede preferirse una vacuna viva porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de clase y magnitud similares a las que se producen en infecciones naturales y, por tanto, confiere inmunidad sustancial de larga duración. La producción de tales formulaciones de vacuna de virus recombinante vivo puede lograrse usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollo seguido por purificación.

En una realización específica, el virus recombinante no es patógeno para el sujeto al que se administra. En este sentido, el uso de virus modificados por ingeniería genética para fines de vacuna puede requerir la presencia de características en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, deleciones) en los moldes usados para la transfección puede dotar a los virus novedosos de características de atenuación. Por ejemplo, pueden hacerse mutaciones de cambio de sentido específicas que están asociadas con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío para dar mutaciones de deleción. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles a la temperatura o el frío y las frecuencias de reversión deben ser extremadamente bajas. Se conocen en la técnica tecnologías de ADN recombinante para modificar por ingeniería genética virus recombinantes. Por ejemplo, en la técnica se conocen técnicas para modificar virus de ARN de cadena negativa, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.166.057.

Alternativamente, pueden construirse virus quiméricos con características “suicidas” para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas descritas en el presente documento. Tales virus experimentarían sólo una o unas pocas rondas de replicación dentro del huésped. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante experimentaría ciclo(s) de replicación limitado(s) e induciría un nivel suficiente de respuesta inmunitaria, pero no iría más allá en el huésped humano ni provocaría enfermedad. Alternativamente, puede formularse el virus inactivado (destruido). Pueden prepararse formulaciones de vacuna inactivadas usando técnicas convencionales para “destruir” los virus quiméricos. Los virus inactivados se “matan” en el sentido de que su infectividad se ha destruido. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede hacerse crecer en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollo, purificarse mediante ultracentrifugación zonal, inactivarse mediante formaldehído o β -propiolactona y agruparse.

En determinadas realizaciones, epítopos completamente foráneos, incluyendo antígenos derivados de los otros patógenos virales o no virales, pueden introducirse por ingeniería genética en el virus para su uso en las

formulaciones de vacuna intradérmicas descritas en el presente documento. Por ejemplo, antígenos de virus no relacionados tales como VIH (gp160, gp120, gp41), antígenos de parásitos (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales pueden introducirse por ingeniería genética en la cepa atenuada.

- 5 Prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga puede construirse en los virus quiméricos descritos en el presente documento para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, pueden expresarse epítomos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes mediante o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en los virus quiméricos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina y neuraminidasa de influenza y parainfluenza y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F de PIV3 humano. En aún otra realización, las secuencias génicas heterólogas que pueden introducirse por ingeniería genética en los virus quiméricos incluyen las que codifican para proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina-1, 2, 4, 5, 6, 12, y antagonistas de estos agentes.

También se describen células o virus patógenos, preferiblemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo variante en su superficie.

- 20 En realizaciones alternativas, las composiciones de vacuna descritas en el presente documento comprenden un polipéptido de fusión en el que un agente antigénico o inmunogénico está operativamente unido a un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene una afinidad potenciada por FcγRIIIA. La modificación por ingeniería genética de polipéptidos de fusión para su uso en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento se realiza usando métodos de tecnología de ADN recombinante de rutina y está dentro del nivel de experiencia habitual.

También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición descrita en el presente documento. Preferiblemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo variante tiene una afinidad superior por FcγRIIB. Aunque no se pretende restringirse a un mecanismo de acción particular, tales composiciones son eficaces en la inducción de tolerancia activando la ruta inhibidora mediada por FcγRIIB.

35 6.6 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

También se describen métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden regiones Fc variantes. También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección administrando a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada descrita en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada descrita en el presente documento. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada está sustancialmente purificado (es decir, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero tal como distinto de primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono tal como un mono cynomolgous y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En aún otra realización preferida, el anticuerpo descrito en el presente documento es de la misma especie que el sujeto.

50 Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una composición que comprende moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos, polipéptidos), que comprenden regiones Fc variantes, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de administración de una molécula descrita en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas descritas en el presente documento se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede emplearse también administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT n.ºs WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

Las moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos, polipéptidos) que comprenden regiones Fc variantes, pueden envasarse en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, las moléculas descritas en el presente documento se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas descritas en el presente documento se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas descritas en el presente documento deben almacenarse a entre 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse en el plazo de 12 horas, preferiblemente en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas o en el plazo de 1 hora tras reconstituirse. En una realización alternativa, las moléculas descritas en el presente documento se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas descritas en el presente documento se suministra en un recipiente herméticamente sellado a al menos 1 mg/ml, más preferiblemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición descrita en el presente documento que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad del estado, y debe decidirse según el criterio del profesional sanitario y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas prueba de modelos *in vitro* o animales.

Para los anticuerpos descritos en el presente documento, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, 0,0001 y 0,15 mg/kg, 0,0001 y 0,10 mg/kg, 0,001 y 0,5 mg/kg, 0,01 y 0,25 mg/kg o 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida más prolongada dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos foráneos. Por tanto, a menudo son posibles dosificaciones inferiores de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos descritos en el presente documento o fragmentos de los mismos pueden reducirse potenciando la captación y penetración tisular de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una realización, la dosificación de las moléculas descritas en el presente documento administradas a un paciente es de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se usan como terapia de un único agente. En otra realización las moléculas descritas en el presente documento se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es menor que cuando dichas moléculas se usan como una terapia de un único agente.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento localmente a la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un de implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula descrita en el presente documento, debe tenerse cuidado de usar materiales a los que la molécula no se absorbe.

En otra realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 3 17-327; véase generalmente *ibid.*).

En aún otra realización, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación sostenida o liberación controlada. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más moléculas descritas en el presente documento. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, citado anteriormente;

Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; y Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véanse por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véanse también Levy *et al.*, 1985, Science 228:190; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); la patente estadounidense n.º 5.679.377; la patente estadounidense n.º 5.916.597; la patente estadounidense n.º 5.912.015; la patente estadounidense n.º 5.989.463; la patente estadounidense n.º 5.128.326; la publicación PCT n.º WO 99/15154; y la publicación PCT n.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En aún otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo por tanto sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). En otra realización, se usan composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada según Dunn *et al.* (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo del sistema de polímero. La implantación puede producirse generalmente en cualquier lugar dentro del cuerpo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de administración sostenida no polimérico, mediante el cual se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, se dispersará o se filtrará de la composición al fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente formando una matriz sólida, microporosa (véase el documento U.S. 5.888.533).

Se comentan sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos descritos en el presente documento. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.526.938; las publicaciones internacionales n.ºs WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song *et al.*, 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.*, 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al.*, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una realización específica en la que la composición descrita en el presente documento es un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que pasa a ser intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente estadounidense n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en unión a un péptido de tipo caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo (véase por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación homóloga.

Para anticuerpos, la dosificación terapéutica o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es normalmente de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg del peso corporal del sujeto. Preferiblemente, la dosificación administrada a un sujeto es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto y más preferiblemente la dosificación administrada a un sujeto es de entre 1 mg/kg y 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos descritos en el presente documento pueden reducirse también potenciando la captación y penetración tisular (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o las proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas descritas en el presente documento puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un sujeto con moléculas descritas en el presente documento en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. Se apreciará también que la dosificación eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del transcurso de un tratamiento particular.

6.6.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones descritas en el presente documento incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. Tales composiciones comprenden una cantidad

- 5 profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico dado a conocer en el presente documento o una combinación de esos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 En una realización particular, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA y/o dicha región Fc variante media en una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende una región
- 15 Fc de tipo natural, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante se une a Fc γ RIIIA con una afinidad mayor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural que se une a Fc γ RIIIA, y dicha región Fc variante se une a Fc γ RIIB con una afinidad menor que una molécula comparable que comprende una región Fc de
- 20 tipo natural que se une a Fc γ RIIB, y/o dicha región Fc variante media en una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además uno o más agentes anticancerígenos.
- 25 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc tal como se determina según la presente descripción, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 30 En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser
- 35 líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa,
- 40 gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

- 45 Generalmente, los componentes de composiciones descritas en el presente documento se suministran o bien por separado o bien se mezclan entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad del agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con
- 50 una botella de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

- Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

60 6.6.2 KITS

- También se describe un kit o envase farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de las moléculas descritas en el presente documento (es decir, anticuerpos, polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes). Adicionalmente, uno o más de otros agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento de una
- 65 enfermedad pueden incluirse también en el kit o envase farmacéutico. También se describe un kit o envase

farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Opcionalmente asociado con tal(es) recipiente(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos.

También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas descritas en el presente documento. En otra realización, un kit comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento de cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que pueden unirse a uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. En determinadas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterápico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

6.7 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, los agentes terapéuticos o profilácticos descritos en el presente documento se someten a prueba preferiblemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo modelo animal, tal como un sistema modelo animal de roedor, para la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica, incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido del paciente se hace crecer en cultivo, y se expone a o se pone en contacto de otra manera con una composición farmacéutica descrita en el presente documento, y se observa el efecto de tal composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profiláctica(s) o terapéutica(s) más terapéuticamente eficaz(es) para cada paciente individual. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos de células implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica descrita en el presente documento tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células.

Pueden someterse a prueba combinaciones de agentes terapéuticos y/o profilácticos en sistemas modelo animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas modelo animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Pueden someterse a prueba combinaciones de agentes terapéuticos y/o profilácticos en un sistema modelo de ratón. Tales sistemas modelo se usan ampliamente y los conoce bien el experto en la técnica. Pueden administrarse repetidamente agentes terapéuticos y/o profilácticos. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administración de los agentes terapéuticos y/o profilácticos, y si tales agentes se administran por separado o como una mezcla.

Modelos animales preferidos para su uso en los métodos descritos en el presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos sobre células efectoras de ratón, por ejemplo, puede usarse cualquier modelo de ratón descrito en el documento U.S. 5.877.396. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, ratones que portan FcγRIIA humano; ratones que portan FcγRIIA humano; ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano.

Preferiblemente, las mutaciones que muestran los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se someterán a prueba para su uso en estudios con modelos animales antes de su uso en seres humanos. Se prefieren anticuerpos que albergan los mutantes de Fc identificados usando los métodos descritos en el presente documento y sometidos a prueba en ensayos de ADCC, incluyendo ch4D5 y ch520C9, dos anticuerpos anti-Erb-B2 y chCC49, un anticuerpo anti-TAG72, para su uso en modelos animales puesto que se han usado previamente en modelo de xenoinjerto de ratón (Hudsiak *et al.*, 1989, Mol. Cell Biol. 9: 1165-72; Lewis *et al.*, 1993, Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-63; Bergman *et al.*, 2001 Clin. Cancer Res. 7: 2050-6; Johnson *et al.*, 1995, Anticancer Res. 1387-93). Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en modelos animales usando métodos descritos anteriormente, por ejemplo usando sistemas de expresión de mamífero y métodos de purificación de IgG dados a conocer y ejemplificados en el presente documento. Un experimento típico requiere al menos aproximadamente 5,4 mg de anticuerpo mutante. Este cálculo se basa en las cantidades promedio de anticuerpo de tipo natural requeridas para proteger a 8-10 ratones de 30 g tras una dosis de carga de 4 µg/g y una dosis de mantenimiento semanal, 2 µg/g, durante diez semanas. También se describen líneas de células tumorales como fuente de tumores de xenoinjerto, tales como células SK-BR-3, BT474 y HT29 que se derivan de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto los receptores de Erb-B2 como de prolactina en su superficie. Las células SK-BR-3 se han usado satisfactoriamente tanto en modelos de tumor de xenoinjerto como ADCC. En otros ensayos, pueden usarse células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano. Estas células expresan el antígeno TAG72 en la superficie de la célula y pueden usarse conjuntamente con el anticuerpo chCC49. El uso de diferentes anticuerpos y múltiples modelos de tumor evitará la

pérdida de mutaciones específicas debido a la incompatibilidad de un mutante de Fc específico de anticuerpo.

Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de anticuerpos de ratón generados contra una diana específica de tumor basándose en la afinidad y especificidad de las regiones CDR de la molécula de anticuerpo y la capacidad de la región Fc del anticuerpo para provocar una respuesta inmunitaria (Wu *et al.*, 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales hechos a medida para someter a prueba la eficacia de interacciones de Fc-FcγR humanos. Pueden usarse parejas de líneas de ratones transgénicos para FcγRIIIA, FcγRIIB y FcγRIIA generados en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licencia con Rockefeller U. and Sloan Kettering Cancer center) tales como las enumeradas en la tabla 13 a continuación.

Tabla 13: Variedades de ratones

Antecedentes de la variedad	FcR humano
Desnudo/CD16A KO	ninguno
Desnudo/CD16A KO	FcγRIIIA
Desnudo/CD16A KO	FcγRIIA
Desnudo/CD16A KO	FcγR IIA y IIIA
Desnudo/CD32B KO	ninguno
Desnudo/CD32B KO	FcγRIIB

Preferiblemente, se someten a prueba en experimentos con modelos animales mutantes de Fc que muestran tanto unión potenciada a FcγRIIIA como unión reducida a FcγRIIB, actividad aumentada en ensayos de ADCC y fagocitosis. Los experimentos con modelos animales examinan el aumento de la eficacia de anticuerpos que llevan mutantes de Fc en ratones transgénicos para FcγRIIIA, deficientes en mCD16A desnudos en comparación con un control al que se le ha administrado anticuerpo nativo. Preferiblemente, se examinan grupos de 8-10 usando un protocolo convencional. Un experimento con modelo animal a modo de ejemplo puede comprender las siguientes etapas: en un modelo de cáncer de mama, se inyectan $\sim 2 \times 10^6$ células SK-BR-3 por vía subcutánea el día 1 con 0,1 ml de PBS mezclado con Matrigel (Becton Dickinson). Inicialmente, se administran un anticuerpo quimérico de tipo natural y control de isotipo para establecer una curva para la dosis terapéutica predeterminada, inyección intravenosa de 4D5 el día 1 con una dosis inicial de 4 µg/g seguido por inyecciones semanales de 2 µg/g. Se monitoriza el volumen tumoral durante 6-8 semanas para medir el progreso de la enfermedad. El volumen tumoral debe aumentar linealmente con el tiempo en animales a los que se les inyectó el control de isotipo. En cambio, debe producirse muy poco crecimiento tumoral en el grupo al que se le inyectó 4D5. Los resultados del estudio de dosis convencional se usan para establecer un límite superior para experimentos que someten a prueba los mutantes de Fc. Estos estudios se realizan usando dosis subterapéuticas de los anticuerpos que contienen mutantes de Fc. Se usó un décimo de la dosis en modelos de xenoinjerto en experimentos realizados en ratones deficientes en FcγRIIB, véase Clynes *et al.*, 2000, Nat. Med. 6: 443-6, con un bloqueo resultante del crecimiento de células tumorales. Puesto que los mutantes descritos en el presente documento muestran preferiblemente un aumento en la activación de FcγRIIIA y una reducción en la unión a FcγRIIB, se examinan los mutantes a un décimo de la dosis terapéutica. El examen del tamaño tumoral a diferentes intervalos indica la eficacia de los anticuerpos a la dosis inferior. El análisis estadístico de los datos usando la prueba de la t proporciona un modo de determinación de si los datos son significativos. Los mutantes de Fc que muestran una eficacia aumentada se someten a prueba a dosis gradualmente inferiores para determinar la dosis más pequeña posible como una medida de su eficacia.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento pueden determinarse usando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*(eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También pueden usarse modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

Los modelos animales principales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de rata de artritis inducida por adyuvante, modelos de rata y ratón de artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster de artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*(eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenanos. La artritis inducida por carragenanos se ha usado

también en conejo, perro y cerdo en estudios de artritis crónica o inflamación. Se usa evaluación histomorfométrica cuantitativa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar un modelo de artritis inducida por carragenanos de este tipo se describen en Hansra P. *et al.*, "Carrageenan-induce arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano tal como se conoce y se describe en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento también pueden evaluarse midiendo la inhibición de edema de la pata inducido por carragenanos en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. *et al.*, "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se ha usado como examen *in vivo* primario para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes terapéuticos o profilácticos de prueba se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de las patas traseras del grupo de prueba en relación con el grupo de control al que se le dosificó vehículo.

Adicionalmente, también pueden usarse modelos animales para enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas en el presente documento (Kim *et al.*, 1992, *Scand. J. Gastroenterol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(supl. 12):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que pueden inducirse en animales. Pueden administrarse polisacáridos sulfatados incluyendo, pero sin limitarse a, amilopectina, carragenanos, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos incluyendo pero sin limitarse a ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético a animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

También pueden usarse modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas en el presente documento. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes tipo 1, autoinmunidad del tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders *et al.*, 1999, *Autoimmunity* 29:235-246; Krogh *et al.*, 1999, *Biochimie* 81:511-515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19:12-24).

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias dadas a conocer en el presente documento para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la descripción puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren agentes terapéuticos y/o profilácticos que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes terapéuticos y/o profilácticos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación de los agentes terapéuticos y/o profilácticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método descrito en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera precisa dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

La actividad anticancerígena de las terapias usadas también puede determinarse usando diversos modelos animales experimentales para el estudio de cáncer tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher).

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas descritas en el presente documento son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas de células tumorales que pueden usarse como fuente para tumores de xenoinjerto incluyen pero no se limitan a, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto receptores de erbB2 como de prolactina. Se han usado células SKBR3 rutinariamente en la técnica como modelos de tumor de xenoinjerto y ADCC.

Alternativamente, pueden usarse células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovarios humano como fuente de tumores de xenoinjerto.

- Los protocolos y las composiciones descritos en el presente documento se someten a prueba preferiblemente *in vitro*, luego *in vivo*, para detectar la actividad profiláctica o terapéutica deseada, antes de su uso en seres humanos. Pueden examinarse agentes terapéuticos y métodos usando células de una línea celular maligna o tumoral. Muchos ensayos convencionales en la técnica pueden usarse para evaluar tal supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, puede someterse a ensayo la proliferación celular midiendo la incorporación de ^3H -timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse mediante tinción con azul tripano, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en cambios de la morfología, crecimiento disminuido y/o formación de colonias en agar blando o formación de red tubular en preparación de matriz extracelular o membrana basal tridimensional, etc.
- Los compuestos para su uso en terapia pueden someterse a prueba en sistemas modelo animales adecuados antes de las pruebas en seres humanos, incluyendo pero sin limitarse a en ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos pueden usarse entonces en los ensayos clínicos apropiados.
- Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias dadas a conocer en el presente documento para el tratamiento o la prevención de cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmunitaria.
- Habiendo ahora descrito en general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención a menos que se especifique.

7. Ejemplos

7.1 ANÁLISIS DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE MUTANTES DE Fc

Se determinaron mutantes de Fc que presentaban afinidad alterada por Fc γ RIIIA y Fc γ RIIB a partir de la tecnología de presentación en levaduras y ensayos de interacción de Fc γ R-Fc tal como se dan a conocer en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. Se sometieron a ensayo los efectos del mutante en ensayos *in vitro* determinando parámetros cinéticos de la unión de anticuerpos ch4-4-20 que albergan los mutantes de Fc usando un ensayo BIAcore (instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.). El Fc γ RIIIA usado en este ensayo fue una proteína monomérica soluble, la región extracelular de Fc γ RIIIA unida a la secuencia de ligador-AVITAG, mientras que el Fc γ RIIB usado en este ensayo fue una proteína dimérica soluble, ambos se prepararon tal como se describe en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. En resumen, el Fc γ RIIB usado fue el dominio extracelular de Fc γ RIIB fusionado al dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG2 humana.

Se inmovilizó BSA-FITC (36 $\mu\text{g/ml}$ en tampón acetato 10 mM a pH 5,0) sobre una de las cuatro células de flujo (célula de flujo 2) de la superficie de un chip sensor a través de química de acoplamiento de amina (mediante modificación de grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de manera que se inmovilizaron aproximadamente 5000 unidades de respuesta (UR) de BSA-FITC sobre la superficie. Tras esto, se "destaparon" los ésteres activos sin reaccionar con una inyección de Et-NH2 1 M. Una vez preparada una superficie adecuada, se hicieron pasar anticuerpos ch 4-4-20 que portaban las mutaciones de Fc sobre la superficie mediante inyecciones de un minuto de una disolución 20 $\mu\text{g/ml}$ a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l/min}$. El nivel de anticuerpos ch-4-4-20 unidos a la superficie osciló entre 400 y 700 UR. A continuación, se inyectaron series de dilución del receptor (Fc γ RIIIA y proteína de fusión de Fc γ RIIB-Fc) en tampón HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, EDTA 3 mM, pH 7,4) sobre la superficie a 100 $\mu\text{l/min}$. Se llevó a cabo la regeneración de anticuerpos entre diferentes diluciones del receptor mediante inyecciones de 5 segundos individuales de NaHCO_3 100 mM pH 9,4; NaCl 3 M.

También se inyectaron las mismas diluciones del receptor sobre una superficie de BSA-FITC sin ningún anticuerpo ch-4-4-20 al comienzo y al final del ensayo como inyecciones de referencia.

Una vez se recogió un conjunto de datos completo, se ajustaron globalmente las curvas de unión resultantes usando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la K_{aso} como la K_{dis} , a partir de las cuales se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D , como la razón de las dos constantes de velocidad (es decir, $K_{\text{dis}}/K_{\text{aso}}$). Pueden encontrarse tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Se alinearon las curvas de unión para dos concentraciones diferentes (200 nM y 800 nM para FcγRIIIA y 200 nM y 400 nM para la proteína de fusión de FcγRIIB) y se ajustaron las respuestas al mismo nivel de anticuerpos capturados, y se restaron las curvas de referencia de las curvas experimentales. Se ajustaron por separado las fases de asociación y disociación. Se obtuvo la constante de velocidad de disociación para el intervalo de 32-34 s de la fase de disociación; se obtuvo el ajuste de fase de asociación mediante un modelo de Langmuir 1:1 y se seleccionó el ajuste de base basándose en criterios de $R_{\text{máx}}$ y χ^2 .

RESULTADOS

La figura 4 muestra la captura de anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes sobre el chip sensor con BSA-FITC inmovilizado. Se inyectaron 6 µl de anticuerpos a una concentración de aproximadamente 20 µg/ml a 5 µl/min sobre la superficie de BSA-FITC. La figura 5 es un sensograma de la unión en tiempo real de FcγRIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes. Se analizó la unión de FcγRIIIA a una concentración de 200 nM y se normalizaron las respuestas de señal de resonancia al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo natural. Se obtuvieron los parámetros cinéticos para la unión de FcγRIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 ajustando los datos obtenidos a dos concentraciones de FcγRIIIA diferentes, 200 y 800 nM (figura 6). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo basándose en los valores de K_{dis} calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. K_D y K_{dis} representan el promedio calculado a partir de las dos concentraciones de FcγRIIIA diferentes usadas. La figura 7 es un sensograma de la unión en tiempo real de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes. Se analizó la unión de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc a una concentración de 200 nM y se normalizaron las respuestas de señal de resonancia al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo natural. Se obtuvieron los parámetros cinéticos para la unión de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 ajustando los datos obtenidos a dos concentraciones de proteína de fusión de FcγRIIB-Fc diferentes, 200 y 800 nM (figura 8). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo basándose en la K_{dis} calculada para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. K_D y K_{dis} representan el promedio de las dos concentraciones de proteína de fusión de FcγRIIB-Fc diferentes usadas.

Los parámetros cinéticos (K_{aso} y K_{dis}) que se determinaron a partir del análisis BIAcore se correlacionaban con la característica de unión de los mutantes tal como se determinó mediante un ensayo ELISA y la actividad funcional de los mutantes tal como se determinó en un ensayo de ADCC. Específicamente, tal como se observa en la tabla 14, los mutantes que tenían una actividad de ADCC potenciada en relación con la proteína de tipo natural, y tenían una unión potenciada a FcγRIIIA tal como se determinó mediante un ensayo ELISA, tenían una K_{dis} mejorada para FcγRIIIA (es decir, una K_{dis} inferior). Por tanto, un valor de K_{dis} inferior para FcγRIIIA para una proteína Fc mutante en relación con una proteína de tipo natural puede tener probablemente una función de ADCC potenciada. Por otro lado, tal como se observa en la tabla 15, los mutantes que tenían una actividad de ADCC potenciada en relación con la proteína de tipo natural, y tenían una unión reducida para la proteína de fusión de FcγRIIB-Fc tal como se determinó mediante un ensayo ELISA, tenían una K_{dis} superior para la proteína de fusión de FcγRIIB-Fc.

Por tanto, los valores de K_{dis} para FcγRIIIA y FcγRIIB pueden usarse como medidas predictivas de cómo se comportará un mutante en un ensayo funcional tal como un ensayo de ADCC. De hecho, las razones de valores de K_{dis} para FcγRIIIA y proteína de fusión de FcγRIIB-Fc de los mutantes con respecto a la proteína de tipo natural se representaron gráficamente frente a los datos de ADCC (figura 9). Específicamente, en el caso de valores de K_{dis} para FcγRIIIA, se representó gráficamente la razón de K_{dis} (wt)/ K_{dis} (mutante) frente a los datos de ADCC; y en el caso de valores de K_{off} para FcγRIIB, se representó gráficamente la razón de K_{dis} (mutante)/ K_{dis} (wt) frente a los datos de ADCC. Números mayores de uno (1) muestran una velocidad de disociación disminuida para FcγRIIIA y una velocidad de disociación aumentada para FcγRIIB-Fc en relación con el tipo natural. Los mutantes que se encuentran dentro del recuadro indicado tienen una velocidad de disociación inferior para la unión a FcγRIIIA y una velocidad de disociación superior para la unión a FcγRIIB-Fc, y presentan una función de ADCC potenciada.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la unión de FcγRIIIA a Ac ch4-4-20 obtenidos mediante "ajuste independiente" de las curvas de unión de 200 nM y 800 nM

Ac ch4-4-20	Kd de BIAcore, nM	K_{aso} , 1/Ms	K_{dis} , 1/s	ELISA, DO	ADCC, %
Wt(0225)	319	$6,0 \times 10^5$	0,170	0,5	17,5
Mut11(0225)	90	$8,22 \times 10^5$	0,0075	0,37	32
Mut5(0225)	214	$8,2 \times 10^5$	0,172	0,75	26
Mut6(0225)	264	$6,67 \times 10^5$	0,175	0,6	23
Mut8(0225)	234	$8,3 \times 10^5$	0,196	0,5	22
Mut10(0225)	128	$9,04 \times 10^5$	0,115	1,0	41
Mut12(0225)	111	$1,04 \times 10^6$	0,115	1,0	37
Mut15(0225)	67,9	$1,97 \times 10^6$	0,133	1,0	15
Mut16(0225)	84,8	$1,60 \times 10^6$	0,133	1,0	15
Mut18(0225)	92	$1,23 \times 10^6$	0,112	1,0	28

Mut25(0225)	48,6	$2,05 \times 10^6$	0,1	1,0	41
Mut14(0225)	75,4	$1,37 \times 10^6$	0,1	1,1	28
Mut17(0225)	70,5	$1,42 \times 10^6$	0,1	1,25	30
Mut19(0225)	100	$1,20 \times 10^6$	0,120	0,75	11
Mut20(0225)	71,5	$1,75 \times 10^6$	0,126	0,5	10

Mut23(0225)	70,2	$1,43 \times 10^6$	0,105	1,25	25
-------------	------	--------------------	-------	------	----

Los mutantes resaltados no se ajustan al grupo mediante datos de ADCC o ELISA.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de la unión de FCRIIB-Fc a Ac ch4-4-20 de tipo natural y mutante obtenidos mediante "ajuste independiente" de las curvas de unión de 200 nM y 800 nM

Ac ch4-4-20	Kd de BIAcore, nM	K _{aso.} , 1/Ms	K _{dis.} , 1/s	ELISA, DO	ADCC, %
Wt(0225)	61,4		0,085	0,4	17,5
Mut11(0225)	82,3		0,1	0,08	32
Mut5(0225)	50		0,057	0,6	26
Mut6(0225)	66,5		0,060	0,35	23
Mut8(0225)	44,2		0,068	0,25	22
Mut10(0225)	41,3		0,05	1,2	41
Mut12(0225)	40,1		0,051	0,4	37
Mut15(0225)	37,8		0,040	1,55	15
Mut16(0225)	40		0,043	1,55	15
Mut18(0225)	51,7		0,043	1,25	28
Mut25(0225)			0,112	0,08	41
Mut14(0225)	95,6		0,089	0,13	28
Mut17(0225)	55,3		0,056	0,38	30
Mut19(0225)	45,3		0,046	1,0	11
Mut20(0225)	24,1		0,028	0,8	10
Mut23(0225)	108		0,107	0,1	25

7.2 EXAMEN DE MUTANTES DE Fc USANDO MÚLTIPLES RONDAS DE ENRIQUECIMIENTO USANDO UN ENSAYO EN FASE SÓLIDA

Los siguientes exámenes de mutantes estaban dirigidos a identificar conjuntos adicionales de mutantes que muestran unión mejorada a FcγRIIIA y unión reducida a FcγRIIB. Se realizó examen secundario de variantes de Fc seleccionadas mediante ELISA seguido por pruebas para determinar la ADCC en el sistema de 4-4-20. Los mutantes se seleccionaron entonces basándose principalmente en su capacidad para mediar en la ADCC por medio de 4-4-20 usando células SK-BR3 recubiertas con fluoresceína como diana y PBMC aisladas de donantes humanos como población de células efectoras. Los mutantes de Fc que mostraron un aumento relativo en ADCC, por ejemplo, una potenciación en un factor de 2, se clonaron entonces en AcMch anti-HER2/neu o anti-CD20 y se sometieron a prueba en un ensayo de ADCC usando las células tumorales apropiadas como dianas. Se analizaron también los mutantes mediante BIAcore y se determinaron sus K_{dis.} relativas.

Examen 1: Agotamiento en fase sólida secuencial y selección usando perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB seguido por selección con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIIA. El objetivo de este examen era la identificación de mutantes de Fc que o bien ya no se unen a FcγRIIB o bien muestran una unión reducida a FcγRIIB. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca sin tratamiento previo ($\sim 10^7$ células) con perlas magnéticas ("My One", Dynal) recubiertas con FcγRIIB. Se separaron las levaduras unidas a perlas de la fracción no unida colocando el tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Se retiraron las células de levaduras que no se unieron a las perlas y se colocaron en medios nuevos. A continuación se unieron a las perlas que estaban recubiertas con FcγRIIIA. Se separaron las levaduras unidas a perlas de la fracción no unida colocando el tubo que contenía la mezcla en un campo magnético. Se retiraron las levaduras no unidas y se retiraron las células unidas agitando con vórtex vigorosamente. Se hicieron crecer de nuevo las células recuperadas en medios que contenían glucosa y se reintrodujeron en medios selectivos que contenían galactosa. Se repitió el proceso de selección. El cultivo final se usó entonces para recoger ADN. Se amplificaron los insertos que contenían el dominio Fc mediante PCR y se clonaron en 4-4-20. Se examinaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ensayos de ADCC y ELISA de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Mutantes seleccionados mediante agotamiento en fase sólida secuencial y selección usando perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB seguido por selección con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIIA.

Mutante	Cambios de aminoácidos
---------	------------------------

MgFc37	K248M
MgFc38	K392T, P396L
MgFc39	E293V, Q295E, A327T
MgFc41	H268N, P396LN
MgFc43	Y319F, P352L, P396L
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D

Exámenes 2 y 3: Mutantes seleccionados mediante FACS, examen en equilibrio y cinético: El examen de la primera biblioteca identificó una mutación en la posición 396, que cambió el aminoácido de prolina a leucina (P396L). Esta variante de Fc mostró una unión aumentada a tanto FcγRIIIA como FcγRIIB. Se construyó una segunda biblioteca usando P396L como línea de base. Se usó mutagénesis por PCR para generar $\sim 10^7$ mutantes, cada uno de los cuales contenía la mutación P396L y contenía cambios de nucleótidos adicionales. Se examinó la biblioteca de P396L usando dos conjuntos de condiciones.

Se realizó un examen en equilibrio usando FcγRIIIA biotinilado-ligador-avitag como un monómero, usando métodos ya descritos. Se incubó un exceso de aproximadamente 10 veces de la biblioteca (10^8 células) en 0,5 ml de FcγRIIIA aproximadamente 7 nM durante 1 h. Se clasificó la mezcla mediante FACS, seleccionando el 1,2% de los compuestos de unión superiores. Se hicieron crecer células de levadura seleccionadas en medios selectivos que contenían glucosa y se reindujeron en medios selectivos que contenían galactosa. Se repitió el examen en equilibrio una segunda vez y se fijó la compuerta de clasificación para recoger el 0,2% de los compuestos de unión superiores. Entonces se hicieron crecer las células de levadura seleccionadas en condiciones selectivas en glucosa. Se usó entonces este cultivo para recoger ADN. Se amplificaron los insertos que contenían el dominio Fc mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio variable de 4-4-20 usando métodos ya descritos. Se examinaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ADCC y ELISA de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Mutantes seleccionados mediante FACS usando un examen en equilibrio con concentraciones de FcRIIIA de aproximadamente 7 nM.	
Mutante	Cambios de aminoácidos
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L
MgFc44	K334N, P396L
MgFc46	P217S, P396L
MgFc47	K210M, P396L
MgFc48	V379M, P396L
MgFc49	K261N, K210M, P396L
MgFc60	P217S, P396L

También se implementó un examen cinético para identificar mutantes con $K_{dis.}$ mejorada en la unión a FcγRIIIA. Se establecieron condiciones para el examen de la biblioteca de P396L usando una cepa con la variante de Fc P396L presentada sobre la superficie de la levadura. En resumen, se incubaron células hechas crecer en condiciones de inducción con monómero de FcγRIIIA biotinilado-ligador-avitag 0,1 μ M durante 1 h. Se lavaron las células para eliminar el ligando marcado. Entonces se incubaron las células marcadas durante diferentes tiempos con monómero de FcγRIIIA no marcado-ligador-avitag 0,1 μ M, se lavaron y luego se tiñeron con SA:PE para el análisis mediante FACS (figura 10). También se tiñeron las células con anticuerpo de cabra anti-Fc humano para mostrar que la presentación de Fc se mantenía durante el experimento.

Basándose en el estudio de competición, se determinó que una incubación de 1 minuto daba como resultado una pérdida de aproximadamente el 50% de la tinción celular. Se eligió este punto de tiempo para el examen cinético usando la biblioteca de P396L. Se incubó un exceso de aproximadamente 10 veces de la biblioteca (10^8 células) con monómero de FcγRIIIA biotinilado-ligador-avitag 0,1 μ M en un volumen de 0,5 ml. Se lavaron las células y luego se incubaron durante 1 minuto con ligando no marcado. Posteriormente se lavaron las células y se marcaron con SA:PE. Se clasificó la mezcla mediante FACS, seleccionando el 0,3% de los compuestos de unión superiores. Se hicieron crecer las células de levadura seleccionadas en medios selectivos que contenían glucosa y se reindujeron en medios selectivos que contenían galactosa. Se repitió el examen cinético una segunda vez y se fijó la compuerta

de clasificación para recoger el 0,2% de los compuestos de unión superiores. Se comparó la biblioteca de P396L no seleccionada con las células de levadura seleccionadas para detectar una unión mejorada mediante FACS (figura 11). Los histogramas muestran el porcentaje de células que se tiñen conjuntamente con tanto FcγRIIIA/PE como anticuerpo de cabra anti-Fc humano/FITC (parte superior derecha).

Las células de levadura seleccionadas de la segunda clasificación se hicieron crecer entonces en condiciones selectivas en glucosa. Se usó entonces este cultivo para recoger ADN. Se amplificaron los insertos que contenían el dominio Fc mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio variable de 4-4-20 usando métodos descritos anteriormente. Se examinaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ADCC y ELISA de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la tabla 18.

Tabla 18

Mutantes seleccionados mediante FACS usando un examen cinético usando cantidades equimolares de CD16A no marcado durante 1 minuto.	
Mutantes	Cambios de aminoácidos
MgFc50	P247S, P396L
MgFc51	Q419H, P396L
MgFc52	V240A, P396L
MgFc53	L410H, P396L
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
MgFc55	R255I, P396L
MgFc57	L242F, P396L
MgFc59	K370E, P396L

Exámenes 4 y 5: Combinación de la etapa de agotamiento de FcγRIIB en fase sólida con la selección de FcγRIIIA mediante clasificación por FACS, usando el alelo 158V de FcγRIIIA

El análisis de variantes de Fc del examen 1 mostró que las mutaciones que se seleccionaron a partir del examen secundario tenían una unión mejorada a tanto FcγRIIIA como FcγRIIB. Por tanto, los datos sugerían que el agotamiento secuencial y la selección usando perlas magnéticas (fase sólida) en las condiciones establecidas no seleccionaban eficazmente la unión diferencial de FcγRIIIA y FcγRIIB. Por tanto, con el fin de examinar más eficazmente mutantes que se unen a FcγRIIIA, al tiempo que tienen una unión reducida o ausente a FcγRIIB, se combinó la fase de agotamiento de FcγRIIB en fase sólida con la selección de FcγRIIIA mediante clasificación por FACS. Esta combinación identificó variantes de Fc que se unen a FcγRIIIA con mayor o igual afinidad que Fc de tipo natural.

Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca sin tratamiento previo ($\sim 10^7$) con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB. Se separaron las levaduras unidas a perlas de la fracción no unida colocando el tubo que contenía la mezcla en un campo magnético. Se retiraron las células de levadura que no se unieron a las perlas y se colocaron en medios nuevos y posteriormente se reindujeron en medios que contenían galactosa. Se repitió el agotamiento de FcγRIIB mediante perlas magnéticas 5 veces. Se analizó la población de levaduras resultante y se encontró que mostraba más del 50% de tinción celular con anticuerpo de cabra anti-Fc humano y un porcentaje muy pequeño de células se tiñeron con FcγRIIIA. Se seleccionaron entonces estas células dos veces mediante una clasificación de FACS usando FcγRIIIA biotinilado-ligador-avitag 0,1 μM (datos no mostrados). El FcγRIIIA era el alotipo 158V. Se analizaron las células de levadura para detectar la unión a tanto FcγRIIIA como FcγRIIB tras cada clasificación y se compararon con la unión por dominio Fc de tipo natural (figuras 12 A-B).

Entonces se hicieron crecer las células de levadura seleccionadas de la segunda clasificación en condiciones selectivas en glucosa. Se usó entonces este cultivo para recoger ADN. Se amplificaron los insertos que contenían el dominio Fc mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio variable de 4-4-20. Se examinaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ADCC y ELISA de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la tabla 19 (mutantes 61-66).

Tabla 19: Mutantes seleccionados mediante agotamiento de perlas magnéticas usando perlas recubiertas con CD32B y selección final mediante FACS usando FcγRIIIA 158Valina o 158Fenilalanina

Mutantes	Cambios de aminoácidos
----------	------------------------

MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N361D
MgFc64	E233G
MgFc65	N276Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T

Examen de mutantes de Fc usando el alelo 158F de FcγRIIIA: Existen Dos alelos diferentes del receptor FcγRIIIA que tienen afinidades de unión diferentes para el dominio Fc de IgG1 (Koene *et al.*, 1997, Blood 90: 1109-1114; Wu *et al.*, 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70). El alelo 158F se une al dominio Fc con una constante de unión 5-10 veces menor que el alelo 158V. Previamente, se realizaron todos los exámenes de Fc usando presentación en levaduras usando el alelo 158V de unión alta como ligando. En este experimento, se seleccionaron mutantes de Fc de la población de levaduras agotada en FcγRIIB usando monómero de FcγRIIIA158F biotinilado-ligador-avitag como ligando. Se fijó la compuerta de clasificación para seleccionar el 0,25 por ciento de los compuestos de unión a FcγRIIIA 158F superiores. Se analizó la población enriquecida resultante mediante FACS (figura 12B). Entonces se aislaron clones individuales y su unión a diferentes FcγR mediante FACS (figura 12B). El análisis de clones individuales a partir de la población dio como resultado la identificación de un único mutante que albergaba 5 mutaciones MgFc67 (V284M, S298N, K334E, R355W, R416S), que tenía una unión potenciada a FcγRIIIA y una unión reducida a FcγRIIB.

Examen secundario de mutantes mediante un ensayo de ADCC para los exámenes 1, 2 y 3: Se analizaron entonces los mutantes que se seleccionaron en los exámenes anteriores usando un ensayo de ADCC convencional para determinar las velocidades de lisis relativas mediadas por ch4-4-20 que alberga los mutantes de Fc. Se construyeron anticuerpos ch4-4-20 que portaban las variantes de Fc usando métodos ya descritos anteriormente. Se usaron células SK-BR3 como dianas y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron de donantes usando un gradiente de Ficoll, tal como se describió anteriormente (sección 7.7). Los resultados de actividad de ADCC para los mutantes se resumen en la tabla 20.

Tal como se observa en la tabla 20, los mutantes aislados usando los exámenes primario y secundario anteriores basados en agotamiento de FcγRIIB y selección de FcγRIIIA mostraron actividad de ADCC potenciada en relación con el tipo natural.

Tabla 20

Análisis de ADCC mediada por anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 en células SKBR3 recubiertas con fluoresceína.		
Mutante	Cambio de aminoácido	Velocidad de lisis relativa
MgFc37	K248M	3,83
MgFc38	K392T, P396L	3,07
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4,29
MgFc41	H268N, P396LN	2,24
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1,09
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	3,17
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	3,3
MgFc44	K334N, P396L	2,43
MgFc46	P217S, P396L	2,04
MgFc47	K210M, P396L	2,02
MgFc48	V379M, P396L	2,01
MgFc49	K261N, K210M, P396L	2,06

MgFc50	P247S, P396L	2,1
MgFc51	Q419H, P396L	2,24
MgFc52	V240A, P396L	2,35
MgFc53	L410H, P396L	2
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	3,59
MgFc55	R255I, P396L	2,79
MgFc57	L242F, P396L	2,4
MgFc59	K370E, P396L	2,47
MgFc60	P217S, P396L	1,44

Se analizaron los mutantes 37, 38, 39, 41, 43 usando ch4-4-20 0,5 µg/ml. Todos los demás anticuerpos se sometieron a prueba a 1 µg/ml. Se normalizaron todas las velocidades a ch4-4-20 de tipo natural (IgG1).

- 5 Se clonaron adicionalmente los mutantes en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antitumoral 4D5 (anti-HER2/neu) y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 2H7 reemplazando el dominio Fc de estos anticuerpos monoclonales. Se expresaron estos anticuerpos monoclonales quiméricos y se purificaron y se sometieron a prueba en un ensayo de ADCC usando métodos convencionales mediante transfección transitoria en células 293H y purificación sobre columna de proteína G. Se sometieron a prueba los anticuerpos quiméricos 4D5 en un ensayo de
- 10 ADCC usando células SK-BR3 como dianas (figura 13), mientras que se sometieron a prueba los anticuerpos quiméricos 2H7 en un ensayo de ADCC usando células Daudi como dianas (figura 14).

Examen secundario de mutantes por medio de BIAcore: Los mutantes que se seleccionaron en los exámenes anteriores se analizaron entonces mediante BIAcore para determinar los parámetros cinéticos para la unión a

15 FcγRIIIA(158V) y FcγRIIB. El método usado fue similar al dado a conocer en la sección 7.1, anteriormente.

Los datos presentados son valores de $K_{dis.}$ en relación con las velocidades de disociación de tipo natural tal como se determina a partir de experimentos que usan los mutantes de Fc en el anticuerpo monoclonal ch4-4-20. Números relativos mayores de uno indican una disminución de la velocidad $K_{dis.}$. Números menores de uno indican un

20 aumento de la velocidad de disociación.

Los mutantes que mostraron una disminución de las velocidades de disociación para FcγRIIIA fueron MgFc38 (K392, P396L), MgFc43 (Y319F, P352L, P396L), MgFc42 (D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D), MgFc43b (K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44 (K334N, P396L), MgFc46 (P217S, P396L), MgFc49 (K261N, K210M, P396L). Los mutantes que mostraron una disminución de la velocidad de disociación para FcγRIIB fueron MgFc38 (K392, P396L), MgFc39 (E293V, Q295E, A327T), MgFc43 (K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44 (K334N, P396L). Los datos de BIAcore se resumen en la tabla 21.

25

Tabla 21: Datos de BIAcore

30

Mutante de Fc	Residuos de AA	FcγRIIIA158V WT/Mut)	($K_{dis.}$)	FcγRIIB WT/Mut)	($K_{dis.}$)
MgFc37	K248M	0,977		1,03	
MgFc38	K392T, P396L	1,64		2,3	
MgFc39	E293V, Q295E,	0,86		1,3	
Mutante de Fc	Residuos de AA	FcγRIIIA158V WT/Mut)	($K_{dis.}$)	FcγRIIB WT/Mut)	($K_{dis.}$)
	A327T				
MgFc41	H268N, P396LN	0,92		1,04	
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1,23		2,29	
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	1,38			
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	1,27		0,89	
MgFc44	K334N, P396L	1,27		1,33	

MgFc46	P217S, P396L	1,17	0,95
MgFc47	K210M, P396L		
MgFc48	V379M, P396L		
MgFc49	K261N, K210M, P396L	1,29	0,85
MgFc50	P247S, P396L		
MgFc51	Q419H, P396L		
MgFc52	V240A, P396L		
MgFc53	L410H, P396L		
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L		
MgFc55	R255I, P396L		
MgFc57	L242F, P396L		
MgFc59	K370E, P396L		
MgFc60	P217S, P396L		
MgFc61	A330V	1	0,61
MgFc62	R292G	1	0,67
MgFc63	S298N, K360R, N361D	1	0,67
MgFc64	E233G	1	0,54
MgFc65	N276Y	1	0,64
MgFc66	A330V, G427M,	1	0,62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T		

7.3 ENSAYOS DE ADCC MEDIADA POR PBMC

MATERIALES Y MÉTODOS

5

Se sometieron a prueba variantes de Fc que muestran una unión mejorada a FcγRIIIA mediante ADCC basada en PBMC usando una razón de efector:diana de 60:1. Se usaron dos sistemas de modelo tumoral diferentes como dianas, SK-BR3 (anti-HER2/neu) y Daudi (anti-CD20). Se cuantificó el porcentaje de lisis específica para cada mutante. Se usó análisis de regresión lineal para representar gráficamente los datos estableciendo el porcentaje de lisis máxima al 100%.

10

La ADCC se activa en células efectoras del sistema inmunitario por medio de una ruta de transducción de señales que se desencadena por una interacción entre FcγR de baja afinidad y un complejo inmunitario. Se derivaron poblaciones de células efectoras de o bien sangre primaria o bien macrófagos derivados de monocitos activados (MDM). Se cargaron las células diana con europio y se incubaron con AcM quimérico y se incubaron posteriormente con las poblaciones de células efectoras. El europio funciona del mismo modo que ⁵¹Cr, pero no es radiactivo y el europio liberado se detecta en un lector de placas fluorescentes. Los linfocitos recogidos de la sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) contienen principalmente células citolíticas naturales (NK). La mayoría de la actividad de ADCC se producirá por medio de las NK que contienen FcγRIIIA pero no FcγRIIB en su superficie.

15

20

Se realizaron experimentos usando dos poblaciones de células diana diferentes, SK-BR-3 y Daudi, que expresaban HER2/neu y CD20, respectivamente. Se establecieron los ensayos de ADCC usando SK-BR-3, Ch4D5/SKBR3 y Rituxan/Daudi recubiertas con Ch4-4-20/FITC (datos no mostrados). Se modificaron los AcM quiméricos usando las mutaciones de Fc identificadas. Se clonaron los mutantes de Fc en ch4D5. Se usó Ac purificado para opsonizar células SK-BR-3 o células Daudi. Se clonaron los mutantes de Fc en ch4D5.

25

RESULTADOS. Los mutantes de Fc mostraron actividad de ADCC mediada por PBMC mejorada en células SK BR3 (figura 13). El gráfico muestra el análisis de regresión lineal de un ensayo de ADCC convencional. Se tituló el anticuerpo a lo largo de 3 log usando una razón de efector con respecto a diana de 75:1. % de lisis = (liberación experimental - SR)/(MR-SR) * 100.

30

Los mutantes de Fc mostraron actividad de ADCC mediada por PBMC mejorada en células Daudi (figura 14).

7.4 ENSAYOS DE ADCC BASADA EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS (MDM)

- 5 La destrucción de células tumorales dependiente de Fc γ R está mediada por macrófagos y células NK en modelos tumorales de ratón (Clynes *et al.*, 1998, PNAS USA, 95: 652-6). Se usaron monocitos sometidos a elutriación de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de los mutantes de Fc para desencadenar citotoxicidad celular de células diana en ensayos de ADCC. Los patrones de expresión de Fc γ RI, Fc γ R3A y Fc γ R2B se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. Se examinó la expresión de Fc γ R a partir de monocitos congelados cultivados en medios que contenían diferentes combinaciones de citocinas y suero humano mediante FACS usando AcM específicos de FcR (figura 15). Se tiñeron las células cultivadas con anticuerpos específicos de Fc γ R y se analizaron mediante FACS para determinar los perfiles de Fc γ R de MDM. Se usaron las condiciones que imitaban mejor la expresión de Fc γ R *in vivo* en macrófagos, es decir, que mostraban la mayor fracción de células que expresan CD16 y CD32B, en un ensayo de ADCC basada en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Para el experimento de la figura 15, se hicieron crecer monocitos congelados sometidos a elutriación durante 8 días en DMEM y FBS al 20% que contenía o bien M-CSF (condición 1) o bien GM-CSF (condición 2). Para el experimento de la figura 16, se cultivaron monocitos congelados sometidos a elutriación durante 2 días en DMEM y FBS al 20% que contenía GM-CSF, IL-2 e IFN γ antes del ensayo de ADCC. Se han desarrollado también condiciones libres de suero que permiten altos niveles de expresión de CD16 y CD32B (datos no mostrados). En resumen, se hicieron crecer monocitos purificados durante 6-8 días en Macrophage-SFM (Invitrogen) que contenía GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-10 e IL-1 β . Aunque la incidencia de células CD32B+/CD16+ en estos cultivos es la más alta usando una mezcla de citocinas, combinaciones de dos de más citocinas también potenciarán la expresión de Fc γ R (M-CSF/IL-6, M-CSF/IL-10; o M-CSF/IL-1 β). Para los ensayos de ADCC, se añade IFN γ durante las 24-48 horas finales.
- 25 La ADCC mediada por MDM requería tiempos de incubación de >16 h para observar destrucción de células diana. Se cargaron las células diana con indio-111 que se retiene durante incubaciones largas dentro de las células diana. Se cuantificó la liberación de indio usando un contador gamma. Todos los demás reactivos, Ac y células diana fueron similares al ensayo de ADCC basada en PBMC. La actividad de ADCC debida a Fc γ RI puede bloquearse eficazmente usando el anticuerpo bloqueante anti-FcRI (M21, Ancell). Las condiciones de ensayo difieren ligeramente del ensayo basado en PBMC. Diana con respecto a efector 20:1; 18-14 h de incubación a 37°C.

Se sometieron a prueba mutantes de Fc que muestran ADCC por PBMC mejorada, unión aumentada a Fc γ RIIIA o unión disminuida a Fc γ RIIB (figura 16).

35 7.5 EFECTO DE MUTANTES DE Fc SOBRE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO

- Se identificaron originalmente mutantes de Fc basándose en su unión disminuida a Fc γ RIIIA. Se validaron posteriormente estos mutantes para determinar su afinidad mejorada por todos los receptores de afinidad baja y en muchos casos actividad mejorada en ADCC mediada por PBMC. La citotoxicidad mediada por anticuerpos *in vivo* puede producirse a través de múltiples mecanismos. Además de ADCC, otros posibles mecanismos incluyen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y apoptosis. La unión de C1q a la región Fc de una inmunoglobulina inicia una cascada que da como resultado lisis celular mediante CDC. La interacción entre C1q y la Fc se ha estudiado en una serie de mutantes de Fc. Los resultados de estos experimentos indican que C1q y el FcR de afinidad baja se unen a regiones solapantes de la Fc, sin embargo los residuos de contacto exactos dentro de la Fc varían.

- Se examinaron mutantes que mostraban ADCC mejorada en el ensayo basado en PBMC para determinar su efecto en CDC. Se analizaron los anticuerpos en el Ch-AcM anti-CD20, 2H7. Se detectó CDC mejorada para cada ch-AcM mutante sometido a prueba. De manera interesante, aun cuando estos mutantes se seleccionaron por su ADCC mejorada, también muestran CDC potenciada.

- MATERIALES Y MÉTODOS. Se usó el ensayo de CDC para someter a prueba los mutantes de Fc usando anticuerpo anti-CD20 y células Daudi como dianas. Se usó suero de cobaya como fuente del complemento (US Biological). El ensayo de CDC fue similar a la ADCC basada en PBMC. Se cargaron células diana con europio y se opsonizaron con ChAcM. Sin embargo, se añadió complemento, suero de cobaya, en lugar de células efectoras. La figura 17 muestra un diagrama de flujo del ensayo. Se tituló ChAcM anti-CD20 a lo largo de 3 órdenes de magnitud. Se calculó el % de lisis. Se marcaron células Daudi, (3 x 10⁶) con reactivo BADTA. Se alicuotaron 1x10⁴ células en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se titularon los anticuerpos en los pocillos usando diluciones de 3 veces. Se permitió que avanzara la reacción de opsonización durante 30-40 minutos a 37°C en el 5% de CO₂. Se añadió suero de cobaya hasta una conc. final del 20%. Se permitió que avanzara la reacción durante 3,5 h at 37°C en el 5% de CO₂. Posteriormente, se añadieron 100 ul de medios celulares a la reacción y se centrifugaron las células. Para la detección, se añadieron 20 ul del sobrenadante a 200 ul de la disolución de europio y se leyeron las placas en el instrumento Victor2 (Wallac).

- 65 RESULTADOS: Todos los mutantes que muestran unión mejorada por o bien FcR activante o bien C1q se colocaron

en el ensayo de CDC (figura 18). Los mutantes de Fc que mostraban unión potenciada a Fc γ RIIIA también mostraban actividad del complemento mejorada. Cada uno de los mutantes muestra actividad del complemento mejorada en comparación con el tipo natural. Los mutantes sometidos a prueba son mutantes dobles. En cada caso, una de las mutaciones presentes es P396L.

Para determinar si el aumento de CDC se correlacionaba con una unión aumentada de C1q a Fc de IgG1, se midió la unión entre las dos proteínas en tiempo real usando resonancia de plasmón superficial. Con el fin de examinar la unión entre C1q y una Fc de IgG1, se clonaron las variantes de Fc en un ch-AcM anti-CD32B, 2B6. Esto permitió capturar los anticuerpos wt y mutante en el portaobjetos de vidrio por medio de proteína CD32B soluble (figura 19A). Tres de los cuatro mutantes sometidos a prueba en CDC también se examinaron en el Biacore. Los 3 mostraron K_{dis} enormemente potenciada en comparación con Fc de tipo natural (figura 19B). El formato de Biacore para la unión de C1q a mutantes de 2B6 de muestra una unión potenciada de mutantes con la mutación P396L (figura 20). La mutación D270E puede reducir la unión de C1q en diferente grado. En la tabla 22 a continuación se representa un resumen del análisis cinético de la unión de Fc γ R y C1q.

Tabla 22. Análisis cinético de la unión de Fc γ R y C1q a 2B6 mutante

Mutantes de 2B6	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl	C1q
Tipo natural	0,192	0,434	0,056	0,070	0,053	0,124
MgFc38 (K392T,P396L)	0,114	0,243	0,024	0,028	0,024	0,096
MgFc51 (Q419H,P396L)	0,142	0,310	0,030	0,036	0,028	0,074
MgFc55 (R255I,P396L)	0,146	0,330	0,030	0,034	0,028	0,080
MgFc59 (K370E,P396L)	0,149	0,338	0,028	0,033	0,028	0,078
MgFc31/60	0,084	0,238	0,094	0,127	0,034	0,210
MgFc51/60	0,112	0,293	0,077	0,089	0,028	0,079
MgFc55/60	0,113	0,288	0,078	0,099	0,025	0,108
MgFc59/60	0,105	0,296	0,078	0,095	0,024	0,107

7.6 DISEÑO DE VARIANTES DE Fc CON UNIÓN DISMINUIDA A Fc γ RIIB

Basándose en una selección de mutantes de Fc que reducen la unión a Fc γ RIIB y aumentan la unión a Fc γ RIIA 131H, se identificaron varias mutaciones incluyendo D270E. Se sometió a prueba cada mutación individualmente para determinar la unión a los receptores de Fc de baja afinidad y sus variantes alélicas.

D270E tenía las características de unión que sugerían que reduciría específicamente la unión a Fc γ RIIB. Se sometió a prueba D270E en combinación con mutaciones que se identificaron anteriormente basándose en su unión mejorada a todos los FcR.

RESULTADOS. Tal como se muestra en las tablas 23 y 24 y las figuras 21 y 22, la adición de la mutación D270E potencia la unión a Fc γ RIIA y Fc γ RIIA H131 y reduce la unión a Fc γ RIIB. La figura 23 muestra el gráfico de datos de ADCC de MDM frente a la K_{dis} tal como se determina para la unión a CD32A H131H para mutantes seleccionados.

TABLA 23

VELOCIDAD DE DISOCIACIÓN (1/s) de LA UNIÓN DE Fc γ R A Ac 4D5 QUIMÉRICO DE TIPO NATURAL Y MUTANTE OBTENIDA MEDIANTE ANÁLISIS BIACORE					
Mutantes de 4D5	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
Puro wt	0,175	0,408	0,078	0,067	0,046
MgFc55	0,148	0,381	0,036	0,033	0,029
MgFc55/60	0,120	0,320	0,092	0,087	0,013
MgFc55/60+R292G	0,116	0,405	0,124	0,112	0,037
MgFc55/60+Y300L	0,106	0,304	0,092	0,087	0,015
MgFc52	0,140	0,359	0,038	0,040	0,026
MgFc52/60	0,122	0,315	0,094	0,087	0,013

MgFc59	0,145	0,378	0,039	0,047	0,033
MgFc59/60	0,117	0,273	0,088	0,082	0,012
MgFc31	0,125	0,305	0,040	0,043	0,030
MgFc31/60	0,085	0,215	0,139	0,132	0,020
MgFc51	0,135	0,442	0,060	0,047	0,062
MgFc51/60	0,098	0,264	0,118	0,106	0,023
MgFc38	0,108	0,292	0,034	0,025	0,032
MgFc38/60	0,089	0,232	0,101	0,093	0,021

Tabla 24. Características cinéticas de mutantes de 4D5

Mutantes de 4D5	3aV158	3aF158	2bfcagl	2aR131Fcagl	2aH131Fcagl
MgFc70	0,101	0,250	0,030	0,025	0,025
MgFc71	0,074	0,212	0,102	0,094	0,020
MgFc73	0,132	0,306	0,190	-----	0,024
MgFc74	0,063	0,370	n.b.	0,311	0,166
WT023 estable	0,150	0,419	0,071	0,068	0,043

5

7.7 ANÁLISIS DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE MUTANTES DE Fc

Se analizaron los parámetros cinéticos de la unión de los anticuerpos quiméricos 4D5 que albergaban mutantes de Fc a los dos alotipos de FcγRIIIA, FcγRIIA 131H y FcγRIIB, mediante BIAcore usando un método similar al dado a conocer en la sección 7.8 anteriormente. Los dos alotipos de FcγRIIIA, FcγRIIIA 158V y FcγRIIIA 158F, se describieron en detalle adicional en la sección 7.9 anteriormente.

10

Materiales y métodos

15 Ambos alotipos de FcγRIIIA usados en este ensayo eran proteínas monoméricas solubles, la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia de ligador-AVITAG tal como se describe en la sección 7.1. El FcγRIIB y FcγRIIA usados en este ensayo eran proteínas dimericas solubles, es decir el dominio extracelular de FcγRIIB o FcγRIIA fusionado al dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG2 humana tal como se describe en la sección 7.1 anteriormente.

20 Se encuentran detalles de la metodología y el análisis de BIAcore en la sección 7.1. En este ensayo, se clonaron regiones Fc variantes en un anticuerpo quimérico 4D5, que es específico para receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu). El antígeno, HER2/neu, se inmovilizó sobre una de las células de flujo del chip sensor. Entonces se hicieron pasar los anticuerpos quiméricos 4D5 que portan las mutaciones de Fc sobre la superficie mediante inyecciones de 3 minutos de una disolución 300 nM a una velocidad de flujo de 5 µl/min. A
25 continuación, se inyectaron series de dilución del receptor en tampón HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 0,005%, EDTA 3 mM, pH 7,4) sobre la superficie a 100 µl/min.

Se alinearon las curvas de unión para dos concentraciones diferentes de receptor (400 nM y 800 nM para tanto FcγRIIIA V158 como FcγRIIIA 158F; 100 nM y 200 nM para tanto FcγRIIA como FcγRIIB) y se ajustaron las
30 respuestas a los mismos niveles de anticuerpos capturados, y se restaron las curvas de referencia de las curvas experimentales. Se ajustaron por separado las fases de asociación y disociación.

Resultados

35 Se analizó la unión de FcγRIIIA, alotipo 158 V y 158F, FcγRIIB y FcγRIIA 131H y se normalizaron las respuestas de resonancia al nivel de respuesta obtenido para un anticuerpo quimérico 4D5 de tipo natural. Se obtuvieron los parámetros cinéticos para la unión de los FcγR al anticuerpo quimérico 4D5 ajustando los datos a dos concentraciones de FcγR diferentes: 400 nM y 800 nM para tanto FcγRIIIA V158 como FcγRIIIA 158F; 100 nM y 200 nM para tanto FcγRIIA como FcγRIIB.

40

La tabla 25 presenta la velocidad de disociación para cada uno de los cuatro receptores analizados en asociación con las regiones Fc variantes indicadas.

Tabla 25

5

Velocidad de disociación (1/s) de la unión de FcγR al Ac 4D5 quimérico de tipo natural y mutante obtenida mediante análisis BIAcore									
	Aminoácido en la posición					Receptor FcγR			
Región Fc de 4D5 quimérico	243	292	300	305	396	3A 158V	3A 158F	2B	2A 131H
Tipo natural	F	R	Y	V	P	0,186	0,294	0,096	0,073
MgFc0088	L	P	L	I	L	0,016	0,064	0,058	0,035
MGFc0143	I	P	L	I	L	0,017	0,094	0,091	0,049
Cuádruple									
MGFc0088A	L	P	L		L	0,016	0,094	0,075	0,044
MGFc0084	L	P		I	L	0,048	0,133	0,278	0,083
MGFc0142	L		L	I	L				
Triple									
MGFc0155	L	P	L			0,029	0,135	0,155	0,057
MGFc0074	L	P		I		0,063	0,37	NB	0,166
MGFc0093		P		I	L	0,080	0,197	0,125	0,190
Doble									
MGFc0162	L	P				0,041	0,515	0,900	0,18
MGFc0091	L				L	0,108	0,330	0,036	0,026
MGFc0070		P		I		0,101	0,250	0,030	0,025
Individual									
SV12/F243L	L					0,048	0,255	0,112	0,100
MGFc0161		P				0,067	0,485	0,421	0,117
		G				0,124	NT	0,384	NT
MGFc0092			L			0,211	NT	0,058	0,02
MGFc0089					L	0,127	0,306	0,031	0,039

La tabla 26 presenta los resultados de un estudio por duplicado en el que se calcularon los valores de $K_{dis.}$ de los anticuerpos quiméricos 4D5 en relación con las velocidades de disociación de tipo natural. Números relativos mayores de uno indican una disminución de la velocidad $K_{dis.}$. Números menores de uno indican un aumento de la velocidad $K_{dis.}$.

10

Tabla 26. Velocidad de disociación relativa de anticuerpos ch4D5 obtenidos mediante análisis BIAcore

Region Fc de 4D5 quimérico	Velocidad de disociación relativa de receptor FcγR ($K_{dis.}$ WT/ $K_{dis.}$ MUT)			
	3A 158V	3A 158 F	2B	2A 131H
F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L	10,06	8,25	1,38	1,11
F243L, R292P, Y300L	6,69	2,3	0,32	0,65
F243L, R292P, P396L	5,37	3,52	0,32	0,65
F243L, R292P, Y300L, P396L	10,06	5,62	1,07	0,89
F243L, R292P, V305I	2,56	1,43	nb*	0,23

Region Fc de 4D5 quimérico	Velocidad de disociación relativa de receptor FcγR (K _{dis.} WT/K _{dis.} MUT)			
	3A 158V	3A 158 F	2B	2A 131H
F243L	4,79	3,44	0,84	0,57
*nb, sin unión (<i>no binding</i>)				

7.8 ENSAYO DE ADCC DE MUTANTES DE Fc

Se analizaron las mutaciones de Fc que se identifica en el ejemplo 7.7 que comprenden una afinidad aumentada por FcγIIIA y/o FcγIIA para determinar su actividad de ADCC relativa.

Materiales y métodos

En la sección 7.1 se encuentran detalles referentes a ensayos de ADCC y en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, y la publicación de solicitud de patente internacional WO 04/063351. En este ensayo, se usaron células de carcinoma de colon HT29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38) cargadas con indio-111 como diana y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron de donantes usando un gradiente de Ficoll. Se opsonizaron las células diana con anticuerpos quiméricos 4D5 que comprenden las regiones Fc variantes a concentraciones finales de 2-5000 ng/ml. Entonces se añadieron las células diana opsonizadas a las células efectoras para producir una razón de efector:diana de 50:1 y se incubaron durante 18 horas a 37°C, el 5% de CO₂. Tras la incubación, se centrifugaron las células a ~220xg durante cinco minutos a 10°C. Se registró el nivel de indio-111 en el sobrenadante mediante un contador gamma.

Resultados

Se seleccionaron anticuerpos quiméricos 4D5 que comprende regiones Fc variantes MGFc88 (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L), MGFc88A (F243L, R292P, Y300L, P396L) y MGFc155 (F243L, R292P, Y300L) basándose en la afinidad potenciada por FcγRIIIA y/o FcγIIA y se sometieron a prueba para determinar su actividad de ADCC. Las figuras 24A y B muestran que las variantes de Fc sometidas a prueba presentaban actividad de ADCC potenciada en relación con anticuerpo de tipo natural a concentraciones de opsonización por encima de 20 ng/ml de una manera dependiente de la concentración. Los datos indican que los mutantes de Fc que se identifica que comprenden una afinidad aumentada por FcγRIIIA también presentan probablemente una actividad de ADCC potenciada.

7.9 CONTROL DEL CRECIMIENTO TUMORAL MEDIADO POR MUTANTES DE Fc EN UN MODELO TUMORAL *IN VIVO*

Se analizaron adicionalmente mutaciones de Fc que se identifica que comprenden una afinidad potenciada por FcγIIIA y/o FcγIIA para determinar la eficacia relativa del control tumoral usando un sistema de modelo tumoral *in vivo*.

Materiales y métodos

Se sometieron a prueba anticuerpos que albergan mutantes de Fc para determinar la actividad antitumoral en un sistema de xenoinjerto murino. Se les inyecta a ratones Balbc/desnudos por vía subcutánea 5x10⁶ células Daudi y posteriormente se monitorizan para detectar signos generales de enfermedad, por ejemplo, aumento/pérdida de peso y actividad de aseo. Sin tratamiento, este sistema modelo da como resultado un 100% de mortalidad con un tiempo de supervivencia promedio de aproximadamente 2 semanas tras la inoculación de células tumorales. El tratamiento consiste en dosis de anticuerpo de tipo natural o anticuerpo que comprende una región Fc variante administradas a intervalos semanales. Los animales a los que se les administró tampón solo a los mismos intervalos sirven como control. Se calcula el peso tumoral basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula (anchura² X longitud)/2.

Resultados

A intervalos semanales, los ratones a los que se les inoculó con células Daudi recibieron 2B6 humanizado de tipo natural ("h2B6"), 2B6 humanizado que comprende FcMG0088 mutante (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) ("h2B6 0088") o tampón solo. El anticuerpo h2B6 de tipo natural y mutante de Fc mostró niveles similares de supresión tumoral al programa de dosis más altas sometido a prueba, dosis semanales de 25 µg (figuras 25A y B). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la eficacia del anticuerpo cuando se redujeron las dosificaciones. Una reducción de 100 y 10 veces en las dosificaciones de h2B6 de tipo natural no proporcionaron mayor control tumoral que la administración de tampón solo (figura 42A). En cambio, h2B6 0088 proporcionó una protección significativa a dosis semanales de 2,5 µg y al menos protección limitada a dosis semanales de 0,25 µg

(figura 25 B).

La protección conferida incluso por la dosis más baja de anticuerpo mutante de Fc se confirmó en las comparaciones de supervivencia. A las 11 semanas, 4 de 7 ratones permanecían vivos en el grupo tratado con dosis de 0,25 µg de h2B6 0088 en comparación con sólo 1 de 7 en el grupo tratado con la misma dosis de h2B6 de tipo natural (figuras 26A y B)

7.10 CONTROL DEL CRECIMIENTO TUMORAL MEDIADO POR MUTANTE DE Fc EN UN MODELO TUMORAL DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE EXPRESA RECEPTOR DE Fc HUMANO

Se analizaron adicionalmente las mutaciones de Fc que se identifica que comprenden una afinidad potenciada por FcγIIIA y/o FcγIIA para determinar la eficacia relativa del control tumoral usando un sistema de modelo tumoral de ratón transgénico para receptor de Fc humano de xenoinjerto *in vivo*.

15 Materiales y métodos

Se sometieron a prueba anticuerpos humanizados contra CD32B humano (h2B6) o HER2/neu (h4D5) que albergan mutaciones de Fc para determinar la actividad antitumoral en un sistema de xenoinjerto murino, en el que se reemplazó FcγIIIA (CD16) de ratón por su ortólogo humano, CD16A (huCD16A). Se les inyectaron a ratones inmunodeficientes 5×10^6 células tumorales y se monitorizaron posteriormente para detectar signos generales de enfermedad, por ejemplo, aumento/pérdida de peso y actividad de aseo. El tratamiento consiste en dosis de anticuerpo de tipo natural o anticuerpo que comprende una región Fc variante administrada a intervalos diarios o semanales (según se establezca). Los animales a los que se les administró tampón solo o anticuerpo que comprende la mutación N297Q (que suprime la unión a cualquier FcγR) a los mismos intervalos sirven como control. Se calculó el peso tumoral basándose en el volumen estimado del tumor subcutáneo según la fórmula ($\text{anchura}^2 \times \text{longitud}$)/2.

Resultados

30 h2B6: Anti-CD32B humanizado y variantes de Fc

A intervalos semanales que comienzan dos semanas después de la inyección del tumor, ratones RAG1-/- C57Bl/6 a los que se les inyectó por vía subcutánea células Raji (células tumorales que expresan CD32B) recibieron 2B6 humanizado de tipo natural ("h2B6"; Rituxan), 2B6 humanizado que comprende FcMG0088 mutante (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) ("h2B6 0088"; "FcMg88" o MGA321) o tampón solo. El anticuerpo h2B6 de tipo natural y mutante de Fc mostró niveles similares de supresión del crecimiento tumoral a dosis semanales de 250 µg y 25 µg (figura 27). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la eficacia del anticuerpo cuando la dosificación se redujo hasta 2,5 µg: A esta dosificación, h2B6 de tipo natural proporcionó un control limitado del crecimiento tumoral en comparación con la administración de tampón solo; en cambio, la dosificación de 2,5 µg de h2B6 0088 retrasó la progresión tumoral tanto como una semana (figura 27). En otro experimento, la eficacia de las dosificaciones inferiores de MGA321 con Fc optimizada sometidas a prueba era equivalente a los controles (PBS o Rituxin a dosificaciones equivalentes); sin embargo, la administración de la dosificación más alta (250 µg) de anticuerpo h2B6 con Fc optimizada proporcionó un control significativo del crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con h2B6 de tipo natural y tampón solo (figuras 28A-2B).

La protección conferida por el anticuerpo mutante de Fc se confirmó en las comparaciones de supervivencia. Se les inyectó a los ratones desnudos (FoxN1) por vía intraperitoneal células EL4-CD32B y luego se trataron los días 0, 1, 2, 3 y 6 con 2B6 1.3 humanizado o 2B6 1.3 humanizado administrado por vía i.p. que comprende 31/60 mutante (P247L, D270E, N421K) ("h2B6 1,3 3160"). A las 14 semanas, al menos el 90% de los ratones tratados con h2B6 1.3 3160 sobrevivían en comparación con el 55% o menos en el grupo tratado con la misma dosis de h2B6 1.3 de tipo natural (figura 29 y figura 30).

En experimentos de supervivencia adicionales en el mismo sistema, se trataron los ratones con 2B6 3.5 humanizado, 2B6 3.5 humanizado administrado por vía i.p. que comprende FcMG0088 mutante (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) ("h2B6 3,5 0088"), 2B6 3.5 humanizado N297Q (control negativo) o tampón solo. A las 14 semanas, todos los ratones tratados con h2B6 3.5 0088 sobrevivían en comparación con el 30% en el grupo tratado con la misma dosis de h2B6 3.5 de tipo natural y <20% en los grupos tratados con el mutante N297Q o PBS (figura 31A; tratamiento el día 0, 1, 2, 3); se logró el mismo resultado para una dosis de tan sólo 4 µg/g de peso corporal (figura 31B; tratamiento el día 0, 1, 2, 3, 4).

Se sometieron a prueba adicionalmente los efectos protectores de anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes en ratones transgénicos que portan CD32A humano además del genotipo mCD16 -/huCD16A+ usando el modelo de EL4-CD32B descrito anteriormente. El tratamiento con h2B6 de tipo natural o control negativo, h2B6 3.5 N297Q, dio como resultado sólo el 20% a los 100 días tras la inoculación del tumor; el tratamiento con anticuerpo con Fc optimizada, h2B6 3.5 0088, aumentó la supervivencia en un 10%, con un 30% de supervivencia a los 100

días tras la inoculación (figura 32).

Se investigó adicionalmente el efecto de la expresión de hCD16A y/o hCD32A en el modelo de tumor EL4-CD32B murino transgénico con tratamiento con anticuerpos h2B6 usando ratones desnudos (FoxN1) positivos para hCD16A, positivos para tanto hCD16A como hCD32A, o positivos para hCD32A, cada uno con antecedentes de mCD16 -/-. Se les inyectó a los ratones transgénicos por vía intraperitoneal células EL4-CD32B y luego se trataron el día 0, 1, 2, y 3 con 2B6 3.5 humanizado de tipo natural ("h2B6 3.5"), 2B6 3.5 humanizado que comprende FcMG0088 mutante (F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L) ("h2B6 3,5 88"), h2B6 N297Q ("h2B6 3,5 N297Q;" control negativo) o tampón solo. A los 100 días tras la inoculación del tumor, todos los ratones positivos para CD16A tratados con h2B6 3.5 88 sobrevivían en comparación con el 50% o menos de supervivencia en los grupos tratados con la misma dosis de h2B6 3.5 de tipo natural o los controles (figura 33A). En ratones que albergan CD32A humano además del genotipo mCD16 -/-huCD16A+, la supervivencia no fue mayor del 25% a los 100 días tras la inoculación independientemente del tratamiento (figura 33B). En ratones que expresan hCD32A pero no hCD16, sólo los ratones en el grupo de tratamiento de Fc optimizada, tratados con h2B6 3.5 88, sobrevivieron más de 1 mes, con el 25% de supervivencia a los 100 días tras la inoculación (figura 33C).

También se investigó el efecto de diferentes transcursores temporales del tratamiento con anticuerpos de Fc optimizada (h2B6 0088; "MGA321") sobre la supervivencia del ratón. La inyección intraperitoneal de ratones con MGA321 inmediatamente tras la inyección del tumor confirió supervivencia en el 75%-100% de los ratones, o bien a una única dosis o bien a múltiples dosis a lo largo de días o semanas consecutivos (figura 34). Cuando se administró por primera vez MGA321 un día o más tarde tras la introducción del tumor, confirió un máximo del 40% de supervivencia, incluso cuando se administró en múltiples dosis a lo largo de días o semanas (figura 34).

ch4D5: Anti-HER2/neu quimérico y variantes de Fc.

Se estableció un modelo tumoral positivo para HER2/neu mediante inyección i.p. de células mSKOV3 (células de tumor de ovario que expresan HER2/neu) en ratones deficientes en mCD16 (FoxN1) que también portaban, y expresaban, CD16A humano o tanto CD16A humano como CD32A humano. A intervalos de 8 semanas, comenzando a tiempo 0, se les inyectó por vía subcutánea a los ratones inoculados anticuerpo quimérico "de tipo natural" contra HER2/neu humano (ch4D5), ch4D5 que comprende FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L) ("ch4D5 0088"), ch4D5 que comprende N297Q (control negativo aglicosilado; "ch4D5 N297Q"), o tampón solo. El tratamiento con ch4D5 0088 suprimió el crecimiento tumoral durante todo el transcurso del experimento (10 semanas) en ratones transgénicos positivos para CD16A humano en los antecedentes mCD16-/- o en ratones transgénicos que albergan CD32A humano además del genotipo mCD16 -/- huCD16A+ (figura 35A o 35B, respectivamente).

La protección conferida por el anticuerpo ch4D5 mutante de Fc se confirmó en comparaciones de supervivencia. Se les inyectó por vía intraperitoneal a ratones desnudos (N/N) deficientes en mCD16 (mCD16 -/-) transgénicos para CD16A humano células mSKOV3 y luego se trataron con 4D5 quimérico de tipo natural ("ch4D5"), ch4D5 que comprende FcMG0088 (F243L, R292P, Y300L, V305I P396L), ch4D5 N297Q (control negativo) o tampón solo. Los ratones a los que se les inoculó el tumor recibieron seis dosis comenzando el día 0 (día de la inoculación del tumor) de 100 µg o 1 µg del anticuerpo administrado por vía i.p. (figura 36A y 36B, respectivamente). A las 14 semanas, ~60% de los ratones tratados con 100 µg de ch4D5 0088 sobrevivían en comparación con ~40% en el grupo tratado con la misma dosis de ch4D5 de tipo natural y <10% de ratones tratados con ch4D5 N297Q o tampón solo (figura 36A). A dosis de 1 µg, la duración global de la supervivencia de ratones tratados con anticuerpos de tipo natural o con Fc optimizada se redujo en relación con los tratados con 100 µg. Sin embargo, a las seis semanas, más del 80% de los ratones tratados con ch4D5 0088 estaban todavía vivos, en comparación con ~10% de los ratones que recibieron los otros tratamientos (figura 36B), confirmando que una dosis moderada de ch4D5 con Fc optimizada confiere una mejora significativa con respecto al anticuerpo de tipo natural en la potenciación de la viabilidad.

Se sometieron a prueba otras variantes de Fc de ch4D5 en experimentos de supervivencia similares.

Un 4D5 quimérico que comprende MGFc0155 mutante (F243L, R292P, Y300L) ("ch4D5 0155") o MCFc3160 mutante (P247L, D270E, N421K) ("ch4D5 3160") se sometió a prueba junto con ch4D5 de tipo natural, ch4D5 N297Q y ch4D5 0088 tal como se describió anteriormente. Los ratones recibieron ocho tratamientos intraperitoneales semanales, comenzando el día 0 (inoculación del tumor), con 100 µg de anticuerpo. En ratones que recibieron dosis de 100 µg, el 100% del grupo tratado con ch4D5 0155 estaban vivos a los 130 días tras la inoculación, en comparación con ~85% de los tratados con ch4D5 0088 y el 50% de los tratados con ch4D5 3160. En cambio, sólo aproximadamente el 30% de los ratones a los que se les administró ch4D5 de tipo natural estaban vivos el día 130. Todos los ratones tratados con tampón solo o ch4D5 N297Q murieron en el plazo de 14 semanas y 10 semanas, respectivamente, tras la inyección del tumor (figura 37A). A una dosificación 10 veces inferior, los anticuerpos con Fc optimizada eran menos eficaces en la potenciación de la supervivencia en comparación con ch4D5 de tipo natural. Mientras que ch4D5 0155 era el más eficaz en la potenciación de la supervivencia a puntos de tiempo más tempranos, a las 18 semanas, ~60% de los ratones en el grupo tratado con ch4D5 0155 o ch4D5 0088 sobrevivían, en comparación con el 50% de los tratados con el tipo natural y el 25% de los tratados con ch 4D5

3160 (figura 37B).

En otro conjunto de experimentos de supervivencia, se les inyectó por vía intraperitoneal a ratones desnudos (N/N) deficientes en mCD16 (mCD16 ^{-/-}) transgénicos para CD16A humano o transgénicos para tanto CD16A humano ("hCD16") como CD32A humano ("hCD32A") células mSKOV3 y entonces, comenzando el día 0, se les administraron ocho tratamientos semanales con ch4D5 de tipo natural, ch4D5 0088, ch4D5 N297Q o tampón solo. A las siete semanas tras la inyección del tumor, todos los ratones tratados con ch4D5 0088 y positivos para hCD16 estaban vivos, mientras que sólo ~30% de los ratones positivos para hCD16 tratados con Ch4D5 N297Q y ~10% de tampón sobrevivían (figura 38A). En ratones desnudos que albergan CD32A humano además del genotipo mCD16 - /huCD16A+, el 50% de los ratones tratados con ch4D5 0088 estaban vivos tras ocho semanas, en comparación con los que recibieron ch4D5 N297Q (el 15% vivos a las ocho semanas) o tampón solo (todos muertos antes de seis semanas) (figura 38B).

7.11 VARIANTES DE Fc QUE PRESENTAN RAZONES DE AFINIDADES ALTERADAS

Las inmunoglobulinas cuyas regiones Fc se habían mutado de la manera descrita anteriormente se examinan para detectar variantes de Fc que tienen razones de afinidades alteradas por FcγRIII y FcγRII evaluando la K_{dis} de las variantes y sus progenitores de inmunoglobulina de tipo natural. Las pruebas se realizan usando los isotipos tanto V158 como F158 de FcγRIII, y frente a FcγRIIB y FcγRIIAH131. Los resultados se resumen en la tabla 27.

TABLA 27 COMPARACIÓN DE K_{dis} DE MUTANTES DE FC CON ANTICUERPO DE TIPO NATURAL (K_{dis} WT/ K_{dis} MUTANTE)						
Secuencia DE FC	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	CD32A H131	Razón de afinidades CD16A/CD32B	
					V158	F158
WT	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
F243L	4,79	3,44	0,84	0,57	5,70	4,10
D270E	1,25	1,48	0,39	2,24	3,21	3,79
R292P	2,90	0,64	0,25	0,53	11,60	2,56
R292G	1,54	--	0,25	0,14	6,2	--
Y300L	1,01	1,17	1,18	1,86	0,86	0,99
P396L	1,27	1,73	2,58	1,63	0,49	0,67
P396L D270E	1,38	1,65	0,89	2,44	1,55	1,85
P396L F243L	1,49	1,60	2,22	1,50	0,67	0,72
P247L N421K	1,29	1,73	2,00	1,30	0,65	0,87
P247L N421K D270E	1,89	2,46	0,58	1,95	3,26	4,24
P247L N421K F243L	1,89	1,71	0,17	0,39	11,12	10,06
P247L N421K D270E F243L	2,30	3,45	0,32	0,98	7,19	10,78
P247L N421K D270E Y300L	2,44	1,16	0,8	1,84	3,05	1,45
R255L P396L	1,09	1,39	2,22	1,34	0,49	0,63
R255L P396L D270E	1,34	1,65	0,87	3,00	1,54	1,90
R255L P396L D270E F243L	1,75	1,64	0,38	1,44	4,61	4,32
R255L P396L D270E R292G	1,39	1,30	0,65	1,05	2,14	2,00
R255L P396L D270E Y300L	1,52	1,74	0,87	2,60	1,75	2,00
K392T P396L	1,49	1,81	2,35	1,22	0,63	0,77
K392T P396L D270E	1,81	2,28	0,79	1,86	2,29	2,89

K392T P396L D270E F243L	3,16	2,44	0,44	1,70	7,18	5,55
Q419H P396L	1,19	1,19	1,33	0,63	0,89	0,89
Q419H P396L D270E	1,64	2,00	0,68	1,70	2,41	2,94
Q419H P396L D270E F243L	1,46	1,15	0,26	1,11	5,62	4,42
R292P F243L	4,73	0,6	0,12	0,34	39,4	5,00
R292P F243L	4	1,67	0,16	0,52	25	10,44
R292P V284M K370N	1,14	1,37	0,37	1,79	3,1	3,7
R292P V3051	1,59	2,11	2,67	1,56	0,60	0,79
R292P V3051	1,32	1,28	0,37	0,75	3,6	3,46
R292P V3051 F243L	2,56	1,43	ND	0,23	>25	>25
R292P V3051 F243L P396L	5,37	2,53	0,40	0,78	13,43	6,33
R292P V3051 F243L P396L Y300L	10,06	8,25	1,38	1,11	7,29	5,98
R292P V3051 F2431 P396L Y300L	10,9	3,12	1,05	1,49	10,4	2,97
R292P F243L P396L Y300L	10,06	5,62	1,07	0,89	9,40	5,25
R292P F243L P300L	6,69	2,3	0,32	0,65	20,9	7,19
R292P V3051 P396L	1,85	1,90	0,92	1,50	2,01	2,07
R292P V3051 P396L F243L	5,37	2,53	0,40	0,78	13,43	6,33
G316D R416G D270E	2,18	2,49	0,78	1,95	2,79	3,19
G316D R416G D270E F243L	1,50	1,34	0,20	1,22	7,50	6,70
G316D R416G D270E P396L	1,22	0,94	1,07	0,95	1,14	0,88

Los mutantes de Fc analizados en este estudio se muestran en la columna a mano izquierda. Las constantes de velocidad de disociación para la unión de la Fc a los diferentes FcR se determinaron mediante análisis Biacore. ND= unión no detectable

Los resultados muestran que los métodos descritos en el presente documento pueden producir ambas moléculas que presentan regiones Fc que tienen una razón de afinidades mayor que el tipo natural (es decir, >1) así como moléculas que presentan regiones Fc que tienen una razón de afinidades menor que el tipo natural (es decir, <1). Un análisis de las variantes de Fc muestra que las moléculas que contienen Fc variante pertenecen a diversas clases, tal como se muestra en la tabla 28.

Tabla 28					
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Razón de V158	CD16A/CD32B
Razón de afinidades >1					
Clase 1: Unión aumentada a CD16; unión disminuida a CD32B					
F243L	4,79	3,44	0,84	5,70	4,10
D270E	1,25	1,48	0,39	3,21	3,79
R292P	2,90		0,25	11,60	
R292G	1,54		0,25	6,2	

ES 2 672 121 T3

P396L D270E	1,38	1,65	0,89	1,55	1,85
P247L N421K D270E	1,89	2,46	0,58	3,26	4,24
P247L N421K F243L	1,89	1,71	0,17	11,12	10,06
P247L N421K D270E F243L	2,30	3,45	0,32	7,19	10,78
R255L P396L D270E	1,34	1,65	0,87	1,54	1,90
R255L P396L D270E F243L	1,75	1,64	0,38	4,61	4,32
R255L P396L D270E R292G	1,39	1,30	0,65	2,14	2,00
R255L P396L D270E Y300L	1,52	1,74	0,87	1,75	2,00
K392T P396L D270E	1,81	2,28	0,79	2,29	2,89
K392T P396L D270E F243L	3,16	2,44	0,44	7,18	5,55
Q419H P396L D270E	1,64	2,00	0,68	2,41	2,94
Q419H P396L D270E F243L	1,46	1,15	0,26	5,62	4,42
R292P F243L	4,73		0,12	39,4	
R292P F243L	4	1,67	0,16	25	10,44
R292P V284M K370N	1,14	1,37	0,37	3,1	3,7
R292P V3051	1,32	1,28	0,37	3,6	3,46
R292P V3051 F243L	2,56	1,43	ND	>25	>25
R292P V3051 F243L P396L	5,37	2,53	0,40	13,43	6,33
R292P F243L P300L	6,69	2,3	0,32	20,9	7,19
R292P V3051 P396L F243L	5,37	2,53	0,40	13,43	6,33
G316D R416G D270E	2,18	2,49	0,78	2,79	3,19
G316D R416G D270E F243L	1,50	1,34	0,20	7,50	6,70
G316D R416G D270E P396L	1,22		1,07	1,14	
Clase II: Unión disminuida a CD16; unión enormemente disminuida a CD32B					
R292P		0,64	0,25		2,56
R292P F243L		0,6	0,12		5,00
Clase III: Unión aumentada a CD16; unión sin cambios a CD32B					
R292P V3051 F243L P396L Y300L	10,9	3,12	1,05	10,4	2,97
R292P F243L P396L Y300L	10,06	5,62	1,07	9,40	5,25
R292P V3051 P396L	1,85	1,90	0,92	2,01	2,07
Clase IV: Unión enormemente aumentada a CD16; unión aumentada a CD32B					
R292P V3051 F243L P396L Y300L	10,06	8,25	1,38	7,29	5,98
G316D R416G D270E P396L	1,22		1,07	1,14	
Razón de afinidades <1					
Clase V: Unión sin cambios a CD16; unión aumentada a CD32B					
Y300L	1,01		1,18		0,99
R255L P396L	1,09		2,22	0,49	
Clase VI: Unión aumentada a CD16; unión enormemente aumentada a CD32B					

Tabla 28					
Fc secuencia	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	razón de afinidades CD16A/CD32B	
				V158	F158
P396L	1,27	1,73	2,58	0,49	0,67
R255L P396L		1,39	2,22		0,63
P396L F243L	1,49	1,60	2,22	0,67	0,72
P247L N421K	1,29	1,73	2,00	0,65	0,87
R255L P396L		1,39	2,22	0,49	0,63
K392T P396L	1,49	1,81	2,35	0,63	0,77
Q419H P396L	1,19	1,19	1,33	0,89	0,89
R292P V305I	1,59	2,11	2,67	0,60	0,79
Clase VII: Unión disminuida a CD16; unión aumentada/sin cambios a CD32B					
G316D R416G D270E P396L		0,94	1,07		0,88

7.12 EFICACIA PREDICTIVA DE LAS RAZONES DE AFINIDADES

- Los dominios Fc de variantes de Fc que presentaban razones de afinidades mejoradas en el contexto del espectro de FcγR murinos se evalúan para determinar su eficacia *in vivo*. Para tal fin, se incorporaron los dominios Fc en un anticuerpo terapéutico prototípico y se sometieron a prueba en modelos de xenoinjerto de ratón de linfoma de células B y en modelos tumorales en ratones deficientes en FcγRIII que expresan el alelo de unión baja de CD16A humano. Se investigó el impacto de la modificación por ingeniería genética de Fc sobre el aclaramiento tumoral usando ratones transgénicos para FcγR humano o WT. Se usó Hu2B6 como AcM modelo, puesto que este anticuerpo no induce lisis por el complemento o apoptosis, sino que inhibe el crecimiento tumoral en ratones mediante mecanismos que son sumamente dependientes de Fcγ (Rankin, C.T. *et al.* 2006 Blood 108:2384-2391). Debido a que hu2B6 no reacciona de manera cruzada con FcγRII murino (m) u otras proteínas murinas endógenas, no hay ninguna diana de anticuerpo distinta de las células tumorales positivas para CD32B implantadas en este modelo (Rankin, C.T. *et al.* 2006 Blood 108:2384-2391). Además, hu2B6 bloquea completamente CD32B humano, eliminando así la unión de la región Fc de hu2B6 a las células diana como factor de confusión. Se seleccionaron las variantes de Fc 088, 3160, 5660, 3860 y 0071 para este fin.

- Las variantes de Fc 088 y 3160 se someten a prueba para el tratamiento de tumores de células B en ratones 16A tg. Las variantes de Fc 088, 3160, 5660, 3860 y 0071 se sometieron a prueba para el tratamiento de tumores de células B en ratones Balb/c.

Modelos tumorales de ratón

- Modelos de xenoinjerto: Se adquirieron ratones desnudos (nu/nu) Balb/c atímicos hembra, de 8-10 semanas de edad, de Taconic. Se suspenden células Daudi (5×10^6 por ratón) en PBS + Matrigel y se inyectan por vía subcutánea en el costado derecho de ratones desnudos Balb/c. Se monitoriza el desarrollo tumoral dos veces a la semana, usando calibres, y se estima el peso tumoral mediante la siguiente fórmula: peso tumoral = $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$. Se realizan inyecciones intraperitoneales (i.p.) de anticuerpos a diversas concentraciones (1 µg/g, o 0,1 µg/g) semanalmente durante 6 semanas, comenzando el día 0.

- Modelo EL4/CD32B:** Se crían ratones desnudos mFcγRIII^{-/-}, hCD16A⁺ atímicos macho y hembra en las instalaciones de animales de MacroGenics, Inc. Se suspenden células EL4/CD32B (1×10^4 por ratón) en PBS y se inyectan por vía i.p. el día 0. Se realizan inyecciones i.p. de anticuerpos (10 µg/g o 4 µg/g) los días 0, 1, 2 y 3. Se mide el peso corporal del ratón dos veces a la semana. Los ratones que muestran un aumento de peso excesivo así como signos de tumores ascíticos se sacrifican mediante asfixia por CO₂. Se registró la supervivencia por consiguiente. Se analizan los datos usando PRISM (Graphpad Software, San Diego California) para el cálculo de la desviación estándar (ADCC, modelo tumoral) y la significación estadística usando pruebas de la T y análisis de rangos logarítmicos (modelos tumorales).

- Para una interpretación mecanística completa de los datos, se caracterizaron completamente los perfiles de unión de la Fcγ modificada por ingeniería genética a los FcγR de ratón (m). De los mFcγR, mFcγRII es estructural y funcionalmente homólogo a CD32B humano, mientras que mFcγRIII y mFcγRIV son receptores relacionados

funcionalmente con Fc γ R activantes humanos expresados en células NK y monocitos/macrófagos, respectivamente (Nimmerjahn, F. *et al.* 2005 Science 310:1510-1512; Nimmerjahn, F. 2005 Immunity 23:41-51). Puesto que la razón de unión de Fc γ a Fc γ R activantes e inhibidores se muestra que es importante en la determinación de los resultados dependientes de anticuerpos *in vivo* (Nimmerjahn, F. *et al.* 2005 Science 310:1510-1512; Nimmerjahn, F. 2005 Immunity 23:41-51), se seleccionan mutantes basándose en sus perfiles de unión (tabla 29) usando FcR humanos. Los datos en la tabla 29 se expresan como cambios en veces en relación con las afinidades de tipo natural.

Tabla 29

MGFc n.º	Mutante de Fc	CD16A ^H	CD16A ^L	CD16A ^H	CD32B	CD16 CD32B
0193	F243L	+3,8	+2,4	-0,8	-0,2	5,7
0089	P396L	+0,3	+0,7	+0,6	+1,6	0,5
3160	P247L D270E N421K	+0,9	+1,5	+1,0	-0,7	3,3
5560	R255L D270E: P396L	+0,3	+0,7	+2,0	-0,1	1,5
3860	D270E K392T P396L	+0,8	+1,3	+0,9	-0,3	2,3
0074	F243L R292P v3051	+1,6	+0,4	-3,3	-13,3	36,6
0071	D270E G316D R416G	+0,4	+0,1	+0,4	-1,7	3,8
0155	F243L R292P Y300L	+6,4	+3,6	0,0	-0,7	12,3
0031	P247L N421K	+0,30	+0,7	+0,3	+1,0	0,6
0161	R292P	+1,4	+0,6	-0,5	-2,7	8,7
0162	F243L R292P	+3,0	+0,7	-0,9	-5,3	24,7
0170	F243L R292P P396L	+5,3	+2,4	+0,4	-1,6	16,0
0092	Y300L	0,0	+0,2	+1,9	+0,2	0,9
0088	F243L R292F Y300L V305I P296L	+9,1	+7,3	+2,2	+0,4	7,3
0084	F243L R292P V305I P396L	-3,0	+1,3	-0,3	-1,6	10,6
Controles						
Tipo natural		0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
AAA*	E333A K334A S298A	+0,6	+0,1	-3,3	-2,5	5,7
XAcM**	S239D I332E 330L	+13,9	+8,1	0,0	+0,74	8,5

El sombreado indica versiones de Fc sometidas a prueba en modelos tumorales de ratón.
 *Véase Presta, L., patente estadounidense n.º 6.737.056; Shields *et al.* 2002, J Biol Chem 277:26733-26740.
 **Véase Lazar, G.A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:4005-4010 (2006).

Los mutantes MGFc3160 (P247E/D270E/N421K) y MGFc0088 mostraron unión aumentada a mFc γ RIII y mFc γ RIV, respectivamente. MGFc3160, sin embargo, mostró unión a mFc γ RIII aumentada de manera simultánea, mientras que MGFc0088 presentó un perfil activante con respecto a inhibidor más favorable, sin aumento en la unión al receptor inhibidor. El mutante MGFc0071 (D270E/G316D/R416G) demostró unión a nivel de Fc γ WT a todos los mFc γ R (tabla 29) y se incluyó como control.

La inoculación subcutánea de células Daudi en ratones desnudos produce tumores localizados, que se expanden progresivamente cuyo crecimiento se reduce significativamente mediante inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) semanales de hu2B6 WT 1 μ g/g (figura 39A). Sin embargo, dosis de 0,1 μ g/g semanales son ineficaces. A la dosis superior, el tratamiento con hu2B6-MGFc3160 es indistinguible de aquel con hu2B6 WT, pero puede detectarse una modesta mejora con respecto a hu2B6 WT a la dosis inferior. Sin embargo, hu2B6-MGFc0088 dio como resultado una reducción significativa en el crecimiento tumoral a todas las dosis sometidas a prueba, consecuente con su unión a mFc γ RIV potenciada y razón de activante con respecto a inhibidor altamente favorable debido a la ausencia de aumento correspondiente en la unión a mFc γ RIII. Hu2B6-MGFc0071, que mostró unión a nivel WT a todos los mFc γ R, se comportó de manera similar a hu2B6 WT (figura 39B).

Aclaramiento tumoral potenciado en ratones transgénicos para CD16A humano

La actividad de AcM con Fc modificada por ingeniería genética se analiza adicionalmente en ratones deficientes en mFc γ RIII que expresan el transgén para el alelo de baja afinidad de CD16A humano (Li, M. *et al.* 1996 J. Exp. Med. 183:1259-1263). En estos ratones, ***células NK y fagocitos mononucleares expresan CD16A-158^{phe} humano, de manera similar a su expresión específica de tipo celular en seres humanos (Perussia, B. *et al.* Eur. J. Immunol. 21:425-429). La línea celular murina, EL4 (Gorer, P.A. (1950) Brit. J. Canc. 4(4):372-379), se transdujo con CD32B humano y se usó en lugar de células Daudi, cuya aceptación tumoral era escasa en estos ratones transgénicos. Los ratones transgénicos deficientes, mFc γ RIII^{-/-}/CD16A-158^{phe+}, a los que se les inyectó por vía i.p. células CD32B-EL4, murieron ocho semanas tras la inoculación. El tratamiento con hu2B6-WT rescató al 40% de los animales, mientras que el 90% sobrevivieron tras recibir hu2B6-MGFc3160 (figura 39C). En un experimento independiente, un régimen de hu2B6-MGFc0088 que no previno el crecimiento tumoral como un Fc γ WT mostró un 100% de supervivencia de ratones durante la duración del experimento (figura 39D). Por tanto, la potencia de hu2B6-MGFc3160 y hu2B6-MGFc0088 *in vivo* se clasifica de manera sistemática con su mejora relativa en la unión a Fc γ R expresados en los

ratones (tabla 29).

Por tanto, se encuentra que la razón de afinidades de una variante de Fc es predictiva de la eficacia *in vivo* de moléculas que comprenden la región variante de Fc. Tanto hu2B6-MGFc3160 como hu2B6-MGFc0088 mostró inhibición potenciada del crecimiento de células tumorales en comparación con AcM WT. Puesto que MGFc3160 mostró una potenciación aislada de la unión a mFcγRIII en ausencia de una interacción mFcγRIV mejorada, el aumento de la actividad podría atribuirse a tanto células NK como fagocitos mononucleares. Por el contrario, las propiedades de MGFc0088, un dominio Fcγ con una afinidad sustancialmente aumentada por mFcγRIV pero propiedades de unión a mFcγRIII similares a las del WT, eran consecuentes con la noción de que los fagocitos mononucleares son las células críticas para la eliminación tumoral mejorada. En el ratón transgénico para huFcγR, la sustitución de mFcγRIII por huCD16A-158^{phe} en tanto células NK como monocitos dio como resultado un aumento en la razón de unión a activante con respecto a inhibidor para MGFc0088. De nuevo, el mayor aumento de la supervivencia de ratones con hu2B6-MGFc0088 se correlacionaba con su afinidad aumentada por el segundo receptor activante, mFcγRIV, expresado por monocitos/macrófagos (Nimmerjahn, F. *et al.* 2005 Immunity 23:41-51). Se determinó la capacidad de variantes de Fc para unirse a receptores FcγRIII y FcγRII humanos/murinos. Los resultados (tabla 30) indican que las variantes se unen a receptores quiméricos con equivalencia sustancial.

Tabla 30				
N.º	Mutante de Fc	hCD16mCD32	hCD16mCD32	hCD16mCD32
0071	D270E G316D R416G		1,0	1,1
3160	P247L D270E N421K	1,7	0,6	2,2
5560	R255L D270E P396L		0,7	1,5
3860	D270E K392T P396L		0,7	1,5
0088	F243L R292F Y300L V305I P396L	10,7	17,3	1,4

La unión de variantes de Fc seleccionadas a receptores de Fc, y sus razones de afinidades se muestran en la en la tabla 31.

Tabla 31								
	3aV	3aF	2bFcagl	2aRfFcagl	2aHfFcagl	32A-131H:32B	16A-158V:32B	16A-158F:32B
wt	1	1	1	1	1	1	1	1
L234F, F243L, R292P, Y300L	1,7	1,6	0,2	0,2	0,3	1,5	8,5	8
L235I, F243L, R292P, Y300L	2,6	3,3	0,2	0,1	0,5	2,5	13	16,5
L235Q, F243L, R292P, Y300L	1,8	1,3	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	n.d.
L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L	6,1	4,8	0,4	0,4	1,3	3,3	15	12
L235P, F243L, R292P, Y300L, P396L	5,4	2,5	0,2	0,2	0,7	3,5	27	12,5

7.13 VARIANTES DE FC DE ANTICUERPOS REACTIVOS CON HER2 QUE PRESENTAN FUCOSILACIÓN DISMINUIDA

Tal como se comentó anteriormente, un aspecto de la presente descripción se refiere al reconocimiento de que variaciones en la región Fc de un anticuerpo pueden interferir con el mecanismo de glicosilación celular y de ese modo producir anticuerpos que presentan un grado disminuido de glicosilación (y en particular, fucosilación). Con el fin de demostrar el efecto de tales variaciones en la región Fc sobre la capacidad de las células para fucosilar los anticuerpos anti-Her2 descritos en el presente documento, se construyó una serie de variantes del anticuerpo anti-Her2/neu ch45D4-FcMT2 (tabla 32).

El anticuerpo ch4D5-FcMT2 tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. ch4D5-FcMT2 tiene una sustitución N65S en la cadena ligera, que da como resultado una cadena ligera desglucosilada, y sustituciones

L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L en la cadena pesada (todas numeradas según Kabat). Este anticuerpo se une a CD16A (FcγRIII-A), y la unión a CD16-158^{Phe} se potencia de un modo proporcionalmente mayor que la unión a CD16-158^{Val}, pero presenta una unión reducida a CD32B (FcγRIIB). Se proporcionan polinucleótidos que codifican para las cadenas ligera y pesada de ch4D5-FcMT2 en SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente.

5

La tabla 32 muestra la razón de K_{dis} de tipo natural/ K_{dis} mutante para anticuerpos que tienen las variaciones de Fc indicadas. Los resultados para el anticuerpo ch45D4-FcMT2 se muestran en negrita en la fila sombreada de la tabla 32 (n.b., sin unión; n.d., unión no detectable).

Tabla 32										
Cambios de aminoácidos					K _{dis.} de tipo natural/K _{dis.} mutante					
					CD16A (158V)	CD16A (158F)	CD32B	CD32A (131H)	CD32A (131R)	
L235V	F243L	R292P	Y300L		2,3	2	n.d.	0,5	n.d.	
L235R	F243L	R292P	Y300L		1,2	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	
L235W	F243L	R292P	Y300L		1,4	0,9	0,5	1,4	0,6	
L235G	F243L	R292P	Y300L		0,8	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	
L235P	F243L	R292P	Y300L		2,6	1,1	n.d.	0,2	n.d.	
L235N	F243L	R292P	Y300L		1,6	0,7	n.d.	0,2	n.d.	
L235T	F243L	R292P	Y300L		2,2	1,5	0,1	0,4	0,1	
L235S	F243L	R292P	Y300L		1,7	1	0,1	0,3	0,1	
L235H	F243L	R292P	Y300L		2	1,1	0,8	1,4	0,8	
L235E	F243L	R292P	Y300L		1,8	1	0,2	0,4	0,2	
L235F	F243L	R292P	Y300L		1,4	1,	0,4	1,3	0,4	
L235Y	F243L	R292P	Y300L		1,9	1,1	0,4	1,4	0,4	
L235K	F243L	R292P	Y300L		0,7	0,5	n.b.	n.b.	n.b.	
L235V	F243L	R292P	Y300L	P396L	6,1	4,8	0,4	1,3	0,4	
L235P	F243L	R292P	Y300L	P396L	5,4	2,5	0,2	0,7	0,2	
L235C	F243L	R292P	Y300L		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.d	
L235A	F243L	R292P	Y300L		2,4	1,3	n.d.	0,4	0,2	
L235D	F243L	R292P	Y300L		1,9	1,1	0,3	0,4	0,3	
L234F	F243L	R292P	Y300L		1,7	1,6	0,2	0,3	0,2	
L235M	F243L	R292P	Y300L		2,3	1,3	0,2	0,3	0,3	
L235I	F243L	R292P	Y300L		2,6	3,3	0,2	0,5	0,1	
L235Q	F243L	R292P	Y300L		1,8	1,3	n.d.	0,2	n.d.	
L235T	F243L	R292P	Y300L	P396L	4,2	2,8	0,3	0,9	0,3	
L235A	F243L	R292P	Y300L	P396L	4,4	2,6	0,4	1,1	0,4	
L234F	F243L	R292P	Y300L	P396L	3,5	2,9	0,3	1,2	0,4	
L235I	F243L	R292P	Y300L	P396L	4,5	4,3	0,5	1,6	0,6	
L235Q	F243L	R292P	Y300L	P396L	3,9	2	0,1	0,7	0,2	
L234F	L235V	F243L	R292P	Y300L	P396L	1,9	2	n.d.	0,5	0,2
L234F	L235I	F243L	R292P	Y300L		1,2	1	n.d.	0,3	n.d.
L234F	L235I	F243L	R292P	Y300L	P396L	1,9	2,3	n.d.	0,9	0,2

10

Para comparaciones adicionales, la tabla 3 muestra la razón de K_{dis} de tipo natural/ K_{dis} mutante para anticuerpos anti-CD20 Ch4D5 (Rituximab) que tienen las variaciones de Fc indicadas (véase Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) "Fc Optimization of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability to Kill Tumor Cells *In vitro* and Controls Tumor Expansion *In vivo* via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors", Cancer Res. 67(18):8882-8890).

15

Tal como resulta evidente a partir de las tablas 3 y 32, los anticuerpos que tienen una variante de Fc que contiene una sustitución en la posición L234 o L235, particularmente en combinación con una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones F243, R292, Y300, V305 y P396, presentan unión de Fc alterada a FcγRIII (por ejemplo, unión mejorada a los receptores activantes (por ejemplo, CD16A, CD32A) y unión reducida a CD32B).

20

Se investigó la glicosilación del anticuerpo ch45D4-FcMT2 usando "análisis de monosacáridos neutros de AcM (hidrólisis de 3 horas)" (para investigar la glicosilación de GLY-2-2-4) y mediante "obtención del perfil de oligosacáridos unidos a N de oligosacáridos neutros usando una separación cromatográfica acuosa" (para investigar la glicosilación de GLY-12-3-2). Los resultados de esta investigación se muestran en la figura 40, paneles A-D. La figura 40, panel A muestra la asignación de monosacáridos unidos a N tal como se determina usando un panel de referencia de anticuerpos. Tal como resulta evidente a partir de la figura 40, los picos de glicanos observados para el anticuerpo ch45D4-FcMT2 (paneles B y C) no corresponden a ninguno de los glicanos mostrados en el panel A. La identidad de los glicanos se determina fácilmente realizando un análisis cromatográfico de los glicanos del anticuerpo ch45D4-FcMT2 en presencia de un glicano conocido añadido, e identificando el glicano conocido que provoca un aumento en el tamaño de pico de cualquiera de los picos mostrados en la figura 40, paneles B y C.

30

El análisis computacional de monosacáridos de los anticuerpos se muestra en la tabla 33 y muestra los pmol/inyección y mol/mol de monosacáridos/anticuerpo para los monosacáridos fucosa (Fuc), galactosa N-acetilada (GALNAc), glucosa N-acetilada (GlcNAc), galactosa (Gal) y manosa (Man). En la tabla 9, BLQ indica que la concentración de monosacárido estaba por debajo del límite de cuantificación. Los niveles muy altos de manosa identificados en el análisis indican que los grados elevados de manosilación potencian la eficacia terapéutica (tal como se mide, por ejemplo mediante la razón de $K_{dis. \text{ mutante}}/K_{dis. \text{ de tipo natural}}$ de anticuerpos que tienen las regiones Fc variantes descritas en el presente documento.

Tabla 33: Análisis de la composición de monosacáridos						
ch45D4-FcMT2		Fuc	GalNAc	GlcNAc	Gal	Man
Muestra 1	pmol/inyección	BLQ*	BLQ	165,8	BLQ	1033,0
		BLQ	BLQ	176,8	BLQ	1014,7
		BLQ	BLQ	205,9	BLQ	1135,8
	mol/mol	≤ 0,2	≤ 0,3	1,8	≤ 0,5	10,5
Muestra 2	pmol/inyección	BLQ	BLQ	77,0	BLQ	698,7
		BLQ	BLQ	104,4	BLQ	836,4
		BLQ	BLQ	127,7	BLQ	924,4
	mol/mol	≤ 0,2	≤ 0,3	1,0	≤ 0,5	8,1

7.14 SITIOS DE VARIACIÓN DE FC ASOCIADOS CON FUCOSILACIÓN DISMINUIDA

Con el fin de evaluar el efecto de las variaciones en las posiciones 234, 235, 243, 292, 300 y 396, solas o en combinación unas con otras, sobre la fucosilación de regiones Fc de IgG, se preparó una serie de variantes de Fc usando la IgG ch4D5 (anti-Her2/neu quimérico), se construyeron h2B6 3.5 (anti-FcγRIIB; véase el documento US 2008/0044417), ch2.4G2 (de rata anti-FcγRII-III de ratón; Kurlander *et al.* (1984) "The Blockade Of Fc Receptor-Mediated Clearance Of Immune complexes *In vivo* By A Monoclonal Antibody (2.4G2) Directed Against Fc Receptors On Murine Leukocytes", J. Immunol. 133(2):855-862; Unkeless, J.C. (1979) "Characterization of a Monoclonal Antibody Directed Against Mouse Macrophage and Lymphocyte Fc Receptors", J. Exper. Med. 150:580-596; las secuencias para las cadenas VH y VL de este anticuerpo están disponibles de Genbank (ACP40510 y ACP40511, respectivamente)), y se determinaron sus patrones de glicosilación respectivos. La tabla 34 muestra los porcentajes a los que se obtuvieron las especies de glicosilación G0F, G1F, G2F, man5, man6, man7, man 8 y man9 en las variantes de Fc de tales anticuerpos (man (manosa), cpx (oligosacárido complejo)).

Variante de Fc	Variación de FC	Porcentaje de glicosilación total										man total	cpx total	Razón de man/cpx
		G0F	G1F	G2F	man5	man6	man7	man8	man9					
Anticuerpo ch4D5														
Fc WT	WT	43	26	7	11		2	1	1		16	76		0,2
1	P396L	31	30	6	21	7	6				33	67		0,5
2	Y300L	34	28	5	13	5	3	2			24	67		0,3
3	F243L													
	R292P	7	6	2	31	12	10	12	9		75	14		5,2
	Y300L													
	P396L													
4	F243L													
	R292P	5	9	11	31	8	10	11	7		66	25		2,6
	Y300L													
5	R292P	51	13	1	15	4	3	2	1		24	66		0,4
6	F243L	8	10	5	30	12	8	7	5		62	23		2,7
	R292P													
7	P396L													
	F243L													
	R292P	6		28		5	12	16	10	43	33			1,3
	P396L													
8	F243L													
	R292P	4	11	10	26	16	10	9	5		66	25		2,6
	P396L													
9	F243L	7	13	14	20	16	13	6	3		58	33		1,7
10	F243V	6	12	33	19		14	6	2		41	51		0,8
11	F243R	6	4	19	12		24	21	5		62	29		2,1

12	F243C	9	16	29	21		11	5	1	38	54	0,7
13	F243F	52	12	2	13	4	4	4	1	27	65	0,4
	R292P											
	Y300L											
14	F243C	7	12	8	31	13	9	7	2	63	26	2,4
	R292P											
	Y300L											
15	F243R	3	3	27	5		29	26	1	61	32	1,9
	R292P											
	Y300L											
16	F243R	3	4	23	4		29	29	2	64	29	2,2
	R292P											
	Y300L											
17	F243V	5	15	12	22	10	9	10	6	58	32	1,8
	R292P											
	Y300L											
18	F243V	5	11	7	30	14	8	9	5	66	24	2,7
	R292P											
	Y300L											
19	L235V	4	9	6	22	12	11	15	12	73	19	3,7
	F243L											
	R292P											
	Y300L											
	P396L											
20	L235V	4	7	3	27	14	11	15	11	78	14	5,4
	F243L											
	R292P											
	Y300L											

[illegible]

31	F243C	8	21	23	18		9	7	3	37	52	0,7
	R292P											
	P396L											
32	F243R	3	5	22	3		29	28	2	63	31	2,1
	R292P											
	P396L											
33	F243V	5	19	21	18	5	10	8	4	45	45	1,0
	R292P											
	P396L											
34	F243F	36	13	3	13	6	5	9	4	38	51	0,7
	R292P											
	Y300L											
	P396L											
35	F243F	36	12		14	7	5	9	4	39	48	0,8
	R292P											
	Y300L											
	P396L											
36	F243C	8	14	8	23	10	10	10	6	59	29	2,0
	R292P											
	Y300L											
	P396L											
37	F243R	4	7	26	4		29	25		58	36	1,6
	R292P											
	Y300L											
	P396L											
38	F243V	5	12	7	22	11	10	12	9	65	25	2,6
	R292P											
	Y300L											

[illegible]

[illegible]

La tabla 35 muestra la unión relativa ($K_{\text{disociación de tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la Fc de IgG CH4D5 de la tabla 34 a CD16A y Cd32B. Valores mayores de 1,0 indican por tanto que la variante de IgG se unía al receptor de Fc con mayor afinidad que Fc de tipo natural, mientras que valores menores de 1,0 indican que la variante de IgG se unía al receptor de Fc con una afinidad disminuida que Fc de tipo natural.

5

Tabla 35						
Variante de Fc	Variación de Fc	Razón de man/cpx	CD16A(V158) (wt/mut)	CD16A(F158) (wt/mut)	CD32B-G2Ag (wt/mut)	CD32A-G2Ag (wt/mut)
Anticuerpo ch4D5						
Fc WT	WT	0,2	1,0	1,0	1,0	1
1	P396L	0,5	2,2	1,5	2,1	1,8
2	Y300L	0,3	1,6	1,2	0,8	1,5
3	F243L	5,2	6,9	4,6	1,2	1,8
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
4	F243L	2,6	3,7	2,2	0,5	1,1
	R292P					
	Y300L					
5	R292P	0,4	1,0	1,0	0,3	0,6
6	F243L	2,7	2,3	1,6	0,4	0,8
	R292P					
	P396L					
7	F243L	1,3	2,3	1,6	0,4	0,8
	R292P					
	P396L					
8	F243L	2,6	2,3	1,6	0,4	0,8
	R292P					
	P396L					
9	F243L	1,7	1,1	1,1	0,8	0,7
10	F243V	0,8	1,0	1,0	0,8	0,7
11	F243R	2,1	0,3	0,3	0,2	0,2
12	F243C	0,7	0,7	0,6	0,3	0,3
13	F243F	0,4	2,1	2,0	0,7	1,3
	R292P					
	Y300L					
14	F243C	2,4	2,6	2,1	0,4	0,9
	R292P					
	Y300L					
15	F243R	1,9	1,1	0,8	0,4	0,9
	R292P					
	Y300L					
16	F243R	2,2	1,1	0,8	0,4	0,9

ES 2 672 121 T3

	R292P					
	Y300L					
17	F243V	1,8	3,5	2,0	0,5	1,1
	R292P					
	Y300L					
18	F243V	2,7	3,5	2,0	0,5	1,1
	R292P					
	Y300L					
19	L235V	3,7	5,3	4,5	0,5	1,3
	F243L					
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
20	L235V	5,4	5,3	4,5	0,5	1,3
	F243L					
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
21	F243C	0,7	2,2	1,1	0,3	0,3
	R292P					
22	F243R	2,2	n.d	n.d	n.d	n.d
	R292P					
23	F243V	0,7	3,0	1,1	0,2	0,4
	R292P					
24	F243L	1,2	4,4	2,5	0,5	1,3
	R292G					
	Y300L					
25	F243L	0,7	2,6	1,7	0,7	1,6
	R292L					
	Y300L					
26	F243L	0,6	2,9	2,1	0,5	1,4
	R292S					
	Y300L					
27	F243L	0,5	2,7	1,9	0,7	1,7
	R292M					
	Y300L					
28	F243L	1,3	1,0	0,8	0,4	0,0
	R292D					
	Y300L					
29	F243L	0,5	1,5	1,4	0,5	1,1
	R292Y					

ES 2 672 121 T3

	Y300L					
30	F243F	0,3	1,6	1,8	0,8	1,4
	R292P					
	P396L					
31	F243C	0,7	2,3	1,5	0,4	0,7
	R292P					
	P396L					
32	F243R	2,1	1,2	0,9	0,3	0,6
	R292P					
	P396L					
33	F243V	1,0	2,4	1,8	0,4	0,9
	R292P					
	P396L					
34	F243F	0,7	4,5	3,4	1,4	2,2
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
35	F243F	0,8	4,5	3,4	1,4	2,2
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
36	F243C	2,0	5,4	3,5	1,1	1,8
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
37	F243R	1,6	1,6	1,5	1,1	1,9
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
38	F243V	2,6	6,4	4,1	1,3	2,0
	R292P					
	Y300L					
	P396L					
39	F243L	0,8	2,2	1,1	0,3	0,4
	R292P					
40	F243L	1,4	5,0	3,6	1,1	1,8
	R292G					
	Y300L					
	P396L					
41	F243L	0,6	3,4	2,8	1,2	1,9
	R292L					

ES 2 672 121 T3

	Y300L					
	P396L					
42	F243L	0,7	2,8	2,2	1,4	2,3
	R292S					
	Y300L					
	P396L					
43	F243L	0,5	3,3	2,3	1,3	2,0
	R292M					
	Y300L					
	P396L					
44	F243L	0,7	3,3	2,3	1,3	2,0
	R292M					
	Y300L					
	P396L					
45	F243L	1,1	1,4	1,1	0,8	1,5
	R292D					
	Y300L					
	P396L					
46	F243L	0,6	2,1	2,0	1,0	1,7
	R292Y					
	Y300L					
	P396L					
47	S239D	0,1	15,9	11,2	1,5	1,2
	A330L					
	I332E					
Anticuerpo 2B6 3.5						
Fc WT	WT	0,1	1	1	1	1
48	F243L	0,1	2,6	1,4	0,2	0,1
	R292P					
	V305I					
49	F243L	0,1	10,1	8,3	3,2	1,4
	R292P					
	Y300L					
	V305I					
	P396L					
Anticuerpo ch2.4G2						
Fc WT	WT	0,1	1	1	1	1
50	F243L	0,1	2,6	1,4	0,2	0,1
	R292P					
	V305I					
51	F243L	0,1	10,1	8,3	3,2	1,4

	R292P					
	Y300L					
	V305I					
	P396L					

Los resultados indican por tanto que variaciones que implican las posiciones 243 y 292 tenían efectos pronunciados sobre el patrón de fucosilación obtenido y sobre la afinidad de unión de Fc a CD16A, CD32A y CD32B (figuras 43-48). En las figuras 43-48, con el fin de mantener un único eje y, el porcentaje de patrones de glicosilación de man5 o man6 observados (% de man56) o de patrones de glicosilación de man7, man8 o man9 observados (% de man789) se muestra dividido entre 10. Por tanto, por ejemplo, un valor notificado de 4,0 en estas figuras para un patrón de glicosilación del % de man56 indica que el 40% de los aductos de glicosilación de la variante eran o bien man5 o bien man6. De manera similar, los valores del porcentaje total de manosa (% de man total) y oligosacáridos complejos totales (% de cpx total) también se muestran divididos entre 10.

La figura 43 muestra el efecto de alterar la identidad del residuo sustituido en la posición F243 de una tetravariante (F243X, R292P, Y300L, P396L) sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones en la posición 243 sola son suficientes para provocar una glicosilación alterada y una afinidad aumentada por CD16A en relación con el tipo natural. F243L podía particularmente aumentar la afinidad por CD16A en relación con Fc de tipo natural.

La figura 44 muestra el efecto de alterar la identidad del residuo sustituido en la posición R292 de una tetravariante (F243L, R292X, Y300L, P396L) sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones en la posición 292 sola son suficientes para provocar una glicosilación alterada y una afinidad aumentada por CD16A en relación con el tipo natural. R292P podía particularmente aumentar la afinidad por CD16A en relación con Fc de tipo natural.

La figura 45 muestra el efecto de alteraciones progresivas en la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243C sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones progresivas en estos sitios potenciaban de manera sinérgica la afinidad por CD16A en relación con Fc de tipo natural.

La figura 46 muestra el efecto de alteraciones progresivas en la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una variante de Fc F243L sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones progresivas en estos sitios potenciaban de manera sinérgica la afinidad por CD16A en relación con Fc de tipo natural, presentando la tetravariante F243L, R292P, Y300L, P396L el mayor aumento en la afinidad de unión a CD16A relativa.

La figura 47 muestra el efecto de alteraciones progresivas en la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una tetravariante F243R sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones en la posición Y300 o Y396 potenciaban de manera sinérgica la afinidad por CD16A de la variante F243R en relación con Fc de tipo natural.

La figura 48 muestra el efecto de alteraciones progresivas en la identidad del residuo sustituido en la posición R292, Y300 y P396 de una tetravariante (F243V, R292X, Y300X, P396X) sobre el perfil de glicosilación observado de la variante y sobre la unión relativa ($K_{\text{disociación tipo natural}}/K_{\text{disociación variante}}$) de la variante de Fc a los receptores de Fc. La figura muestra que modificaciones progresivas en estos sitios potencian de manera sinérgica la afinidad por CD16A en relación con Fc de tipo natural, presentando la tetravariante F243V, R292P, Y300L, P396L el mayor aumento en la afinidad de unión a CD16A relativa.

Lista de secuencias

<110> MacroGenics, Inc.
Johnson, Leslie S.
Rainey, Godfrey
Lerner, Laura
Gorlatov, Sergey

<120> Polipéptidos que contienen región Fc que presentan una función efectora mejorada debido a alteraciones del

grado de fucosilación, y métodos para su uso

<130> 1301.00341

5 <150> Documento US61/249.510
<151> 07-10-2010

<150> Documento PCT/US09/38201
<151> 25-03-2009

10 <150> Documento US 61/041.649
<151> 02-04-2008

<160> 48

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 121

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada humanizada

25

<400> 1

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

<210> 2

30 <211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Región variable de cadena pesada humanizada H2B6VH-A

<400> 2

ES 2 672 121 T3

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

<210> 3
 <211> 121
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada humanizada H2B6VH-3

<400> 3

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

<210> 4
 15 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Region variable de cadena ligera de 2B6 humanizado Hu2B6VL-1

<400> 4

ES 2 672 121 T3

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

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado Hu2B6VL-2

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado Hu2B6VL-3

<400> 6

ES 2 672 121 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(107)
 <223> Región variable de cadena ligera de 3H7 de ratón

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera humanizada - H2B6VL-5

<400> 8

ES 2 672 121 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de cadena pesada variable humano 8B5.3.4 VH

10

<400> 9

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de cadena ligera variable humano 8B5.3.4 VL

20

<400> 10

ES 2 672 121 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dominio de cadena ligera variable humano 8B5.3.4 VL

<400> 11
 gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgccg cgctgggaga aagagtcagt 60
 ctcaattgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120
 gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcattccatt tagattctgg tgtcccaaaa 180
 aggttcagtg gcagtgaagc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240
 gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgt 300
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 12
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dominio de cadena pesada variable humano 8B5.3.4 VH

<400> 12
 gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60
 tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagttc 120
 ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 180
 tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240
 gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcattttatta ctgtgggggt 300
 ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcg 348

<210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(121)
 <223> Región variable de cadena pesada de 2B6 de ratón

<400> 13

ES 2 672 121 T3

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

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(107)
 <223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de ratón

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDRI de región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 15

Asn Tyr Trp Ile His
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR1 de región variable de cadena pesada de 3H7
 <400> 16
 Asp Ala Trp Met Asp
 1 5
 10
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena pesada 2B6
 20 <400> 17
 Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena pesada de 3H7
 30 <400> 18
 Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> CDR3 de región variable de cadena pesada de 2B6
 40 <400> 19
 Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10
 45 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> CDR1 de región variable de cadena ligera de 2B6
 <400> 20
 Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5
 55

ES 2 672 121 T3

```

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> CDR1 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 21
          Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
10          1              5              10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de región variable de cadena ligera de 3H7

20 <400> 22
          Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
          1              5              10

<210> 23
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6
30
<400> 23
          Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
          1              5

<210> 24
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 24
          Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
          1              5

45 <210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 25
          Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
          1              5

55 <210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
60
<220>

```

ES 2 672 121 T3

<223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 3H7

<400> 26

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> CDR3 de región variable de cadena ligera de 2B6

<400> 27

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

15

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CDR3 de región variable de cadena ligera de 3H7

25

<400> 28

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 29

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 2B6 humanizado

35

<400> 29

ES 2 672 121 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Leu Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Pro Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Leu
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Ile Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

ES 2 672 121 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 30
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena ligera de anticuerpo 2B6 humanizado

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 672 121 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 1255
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Receptor Her2/neu

<400> 31

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

ES 2 672 121 T3

260					265					270					
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
		275					280					285			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
	290					295					300				
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln
305					310					315					320
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
				325					330					335	
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
			340					345					350		
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys
		355					360					365			
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp
	370					375					380				
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe
385					390					395					400
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
			405					410						415	
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg
			420					425					430		
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
		435				440						445			
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly
	450					455					460				
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val
465					470					475					480
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr
				485				490						495	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys
		515					520					525			
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys
	530					535					540				
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys
545					550					555					560
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys
				565					570					575	
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp
			580					585					590		
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu
		595					600					605			
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln
	610					615					620				

ES 2 672 121 T3

Pro 625	Cys	Pro	Ile	Asn 630	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val 635	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys 640
Gly	Cys	Pro	Ala 645	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro 650	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile 655	Ser
Ala	Val	Val	Gly 660	Ile	Leu	Leu	Val	Val 665	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly
Ile	Leu	Ile 675	Lys	Arg	Arg	Gln 680	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr 685	Thr	Met	Arg
Arg 690	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu 695	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly
Ala 705	Met	Pro	Asn	Gln 710	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu 715	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu 720
Arg	Lys	Val	Lys 725	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala 730	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys 735
Gly	Ile	Trp 740	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn 745	Val	Lys	Ile	Pro	Val 750	Ala	Ile
Lys	Val 755	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro 760	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu 765
Asp 770	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala 775	Gly	Val	Gly	Ser	Pro 780	Tyr	Val	Ser	Arg
Leu 785	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu 790	Thr	Ser	Thr	Val	Gln 795	Leu	Val	Thr	Gln	Leu 800
Met	Pro	Tyr	Gly 805	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val 810	Arg	Glu	Asn	Arg	Gly	Arg 815
Leu	Gly	Ser	Gln 820	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp 825	Cys	Met	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly 830
Met	Ser	Tyr 835	Leu	Glu	Asp	Val	Arg 840	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala 845
Arg 850	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ser 855	Pro	Asn	His	Val	Lys 860	Ile	Thr	Asp	Phe
Gly 865	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu 870	Asp	Ile	Asp	Glu	Thr 875	Glu	Tyr	His	Ala	Asp 880
Gly	Gly	Lys	Val 885	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala 890	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Arg 895
Arg	Arg	Phe	Thr 900	His	Gln	Ser	Asp	Val 905	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val 910
Trp	Glu 915	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ala 920	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly 925	Ile	Pro	Ala
Arg 930	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu 935	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro 940
Pro 945	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp 950	Val	Tyr	Met	Ile	Met 955	Val	Lys	Cys	Trp	Met 960
Ile	Asp	Ser	Glu 965	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg 970	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Phe 975
Ser	Arg	Met	Ala 980	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg 985	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	Glu 990

ES 2 672 121 T3

```

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
   995                               1000                               1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
  1010                               1015                               1020
Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
  1025                               1030                               1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
  1040                               1045                               1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
  1055                               1060                               1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
  1070                               1075                               1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
  1085                               1090                               1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
  1100                               1105                               1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
  1115                               1120                               1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
  1130                               1135                               1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
  1145                               1150                               1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
  1160                               1165                               1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
  1175                               1180                               1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
  1190                               1195                               1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
  1205                               1210                               1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
  1220                               1225                               1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
  1235                               1240                               1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
  1250                               1255

```

<210> 32
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<220>
 <221> MISC FEATURE
 10 <222> (1)..(120)
 <223> Secuencia de aminoácidos murina del anticuerpo 4d5 (cadena pesada)

<400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

ES 2 672 121 T3

```

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

```

<210> 33
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(109)
 <223> Secuencia de aminoácidos murina del anticuerpo 4d5 (cadena ligera)

```

<400> 33
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1              5              10              15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20              25              30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35              40              45
Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50              55              60
Asn Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65              70              75              80
Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85              90              95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100             105

```

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(120)
 <223> Secuencia de aminoácidos humanizada del anticuerpo 4d5 (cadena pesada)

<400> 34

ES 2 672 121 T3

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

<210> 35

<211> 109

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(109)

<223> Secuencia de aminoácidos humanizada del anticuerpo 4d5 (cadena ligera)

<400> 35

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

15

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CDR1 de región variable de cadena pesada de 4D5

<400> 36

ES 2 672 121 T3

```

                                Asp Thr Tyr Ile His
                                1           5

<210> 37
<211> 16
5  <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
    <223> CDR2 de región variable de cadena pesada de 4D5
10  <400> 37
        Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
        1           5           10           15

    <210> 38
15  <211> 11
    <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
20  <223> CDR3 de región variable de cadena pesada de 4D5

    <400> 38
        Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
        1           5           10

25  <210> 39
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Artificial

30  <220>
    <223> - CDR1 de región variable de cadena ligera de 4D5

    <400> 39
        Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
        1           5           10

35  <210> 40
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Artificial
40  <220>
    <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de 4D5

    <400> 40
        Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr
        1           5

45  <210> 41
    <211> 9
    <212> PRT
50  <213> Artificial

    <220>
    <223> CDR3 de región variable de cadena ligera de 4D5

55  <400> 41
        Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
        1           5

    <210> 42
    <211> 451
60  <212> PRT

```

ES 2 672 121 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 2B6 humanizado

5

<400> 42

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 672 121 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 43
<211> 1356
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada de anticuerpo 2B6 humanizado
<400> 43

ES 2 672 121 T3

cagggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctgggggcctc	agtgaaggctc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	aactactgga	tacactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gattggagtg	attgatcctt	ctgatactta	tccaaattac	180
aataaaaaagt	tcaagggcag	agtcaccatg	accgtagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagaaaacggt	300
gattccgatt	attactctgg	tatggactac	tgggggcaag	ggaccacggt	caccgtctcc	360
tcagcctcca	caaagggccc	atcgggtctt	cccttggcac	cctcctccaa	gagcacctct	420
gggggacacag	cgggcctggg	ctgcctgggt	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacgggtg	480
tcgtggaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggtgt	cctacagtc	540
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggt	accgtgccct	ccagcagctt	gggacccag	600
acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gagagttgag	660
cccaaattctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	720
ggaccgtcag	tcttctctct	acccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc	780
cctgaggtga	catgcgtggg	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	840
tggtagcgtg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccgcgga	ggagcagtac	900
aacagcacgc	tccgtgtggt	cagcatcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	960
aaggagtaca	agtgaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	ccccatcga	gaaaaccatc	1020
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccggtat	1080
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgccctggta	aaggcttcta	tcccagcgac	1140
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctctc	1200
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcttc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1260
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgtccc	gtgatgcatt	aggctctgca	caaccactac	1320
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatga			1356

<210> 44

5 <211> 645

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de anticuerpo 2B6 humanizado

<400> 44

gaaattgtgc	tgactcagtc	tccagacttt	cagtctgtga	ctccaaagga	gaaagtcacc	60
ttcacctgca	ggaccagtca	gagcattggc	acaaacatac	actggtacca	gcagaaacca	120
gatcagtcct	caaagctcct	catcaaggag	gtttctgagt	ctatctctgg	agtcccacg	180
aggttcagtg	gcagtggtatc	tgggacagat	ttcaccctca	ccatcaatag	cctggaagct	240
gaagatgctg	caacgtatta	ctgtcaacaa	agtaatacct	ggccgttcac	gttcggcgga	300
gggaccaag	tggagatcaa	acgaactgtg	gctgcacat	ctgtcttcat	cttcccgcca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaa	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttag		645

15 <210> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Quimérico (murino-humano)

<400> 45

ES 2 672 121 T3

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

- 5 <210> 46
- <211> 450
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Quimérico (murino-humano)
- <400> 46

ES 2 672 121 T3

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

ES 2 672 121 T3

[illegible]

<210> 47
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Quimérico (murino-humano)

<400> 47

gacatcgtga	tgacccagtc	ccacaagttc	atgtccacct	ctgtgggcca	tagggtcagc	60
atcacctgca	aggccagcca	ggatgtgaat	actgctgtag	cctgggtatca	gcagaaacca	120
ggacattctc	ccaaactgct	gatttactcc	gcatacttcc	ggtacactgg	agtccctgat	180
cgcttcaactg	gcagcagatc	tgggacagat	ttcactttca	ccatcagcag	tgtgcaggct	240
gaagacctgg	cagttttatta	ctgtcagcaa	cattatacta	cacctcccac	cttcggaggg	300
ggtaccaagg	tggagatcaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgccca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgtttgtgt	gcctgctgaa	taactttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgcc	tccaatcggg	taactcccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccttgacg	540
ctgagcaaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gaacttcaac	aagggagagt	gttag		645

<210> 48

<211> 1353
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Quimérico (murino-humano)

<400> 48
 caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc actcaagttg 60
 tcctgtacag cttctggctt caacatcaaa gacacctata tccactgggt gaaacagagg 120
 cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg atttatccta ccaatggcta tactagatat 180
 gacccaaagt tccaggacaa ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
 ctgcaagtca gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga 300
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggag cctccgtgac cgtgagctcc 360
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 480
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cgtgggggga 720
 ccgtcagtct tcctcttacc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac 900
 agcacgtcc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1353

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de una sustitución de aminoácido en una región Fc de IgG humana para atenuar la fucosilación postraducciona
- 5 (A) comprende una sustitución de aminoácido en relación con una región Fc de tipo natural, en el que dicha sustitución de aminoácido es en una o más de posiciones L234, L235, F243, R292, Y300, V305 o P396; y
- 10 (B) presenta una razón de glicosilación de oligosacárido con alto contenido en manosa con respecto a glicosilación de oligosacárido complejo que es mayor de 0,2.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha sustitución de aminoácido comprende L234F y L235V.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha región Fc comprende una sustitución de aminoácido en la
- 15 posición F243, R292, Y300 o P396, opcionalmente en el que:
(a) dicha sustitución en la posición F243 es F243C, F243L o F243R;
(b) dicha sustitución en la posición R292 es R292G, R292L, R292M, R292P, R292S o R292Y;
(c) dicha sustitución en la posición Y300 es Y300L;
(d) dicha sustitución en la posición P396 es P396L.
- 25 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha región Fc es la región Fc de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un anticuerpo de cadena sencilla.
- 30 5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a CD16A, CD32B, HER2/neu, A33, CD5, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD40, CD45, CD79a, CD79b, CD103, CTLA4, ErbB1, ErbB3, ErbB4, receptor de VEGF, receptor de TNF- α , receptor de TNF- β o receptor de TNF- γ .
- 35 6. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un antígeno de cáncer asociado con un cáncer, opcionalmente en el que dicho cáncer es o bien (i) cáncer de mama, de ovarios, de próstata, cervical, de pulmón o pancreático; o bien (ii) cáncer de mama y dicho antígeno es HER2/neu.
7. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha región Fc presenta afinidad alterada por un receptor de CD16A, un receptor de CD16B, un receptor de CD32B o un receptor de CD32A.
- 40 8. Uso según la reivindicación 7, en el que dicha región Fc presenta o bien i) afinidad disminuida por un receptor de CD32B; y/o bien ii) afinidad aumentada por un receptor de CD16A.
- 45 9. Uso según la reivindicación 1, en el que la razón de glicosilación de oligosacárido con alto contenido en manosa con respecto a glicosilación de oligosacárido complejo es mayor de aproximadamente 0,5 y menor de aproximadamente 5,5.

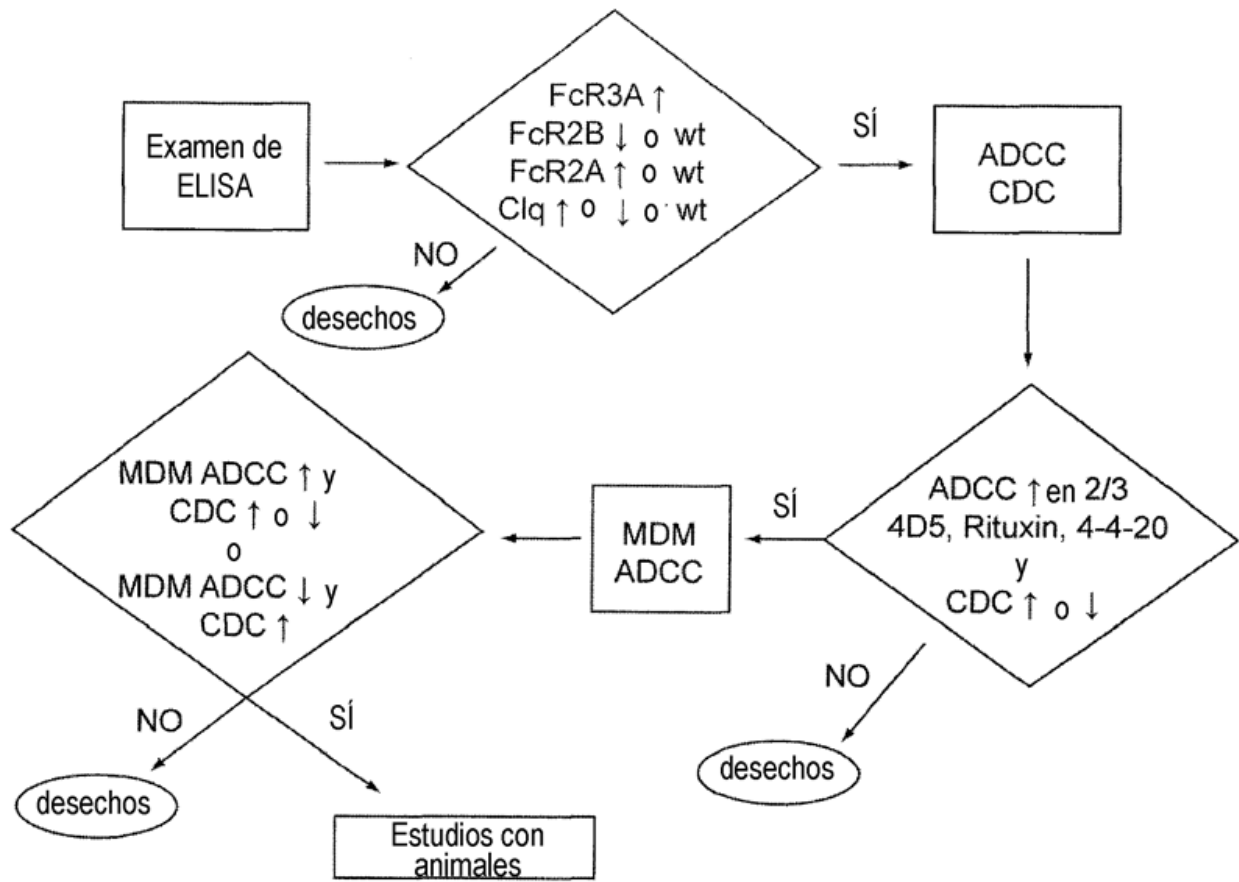


FIG. 1

Secuencia de nucleótidos/aminoácidos de VH de 8B5.3.4

gaa	gtg	aag	ctt	gag	gag	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	caa	cct	gga	gga	48
Glu	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	atg	aaa	ctc	tct	tgt	gaa	gcc	tct	gga	ttc	act	ttt	agt	gac	gcc	96
Ser	Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ala	
			20					25					30			
CDR1																
tgg	atg	gac	tgg	gtc	cgt	cag	tct	cca	gag	aag	ggg	ctt	gag	tgg	ggt	144
Trp	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
CDR2																
gct	gaa	att	aga	aac	aaa	gct	aaa	aat	cat	gca	aca	tac	tat	gct	gag	192
Ala	Glu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Lys	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	
	50					55					60					
tct	gtg	ata	ggg	agg	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tcc	aaa	agt	agt	240
Ser	Val	Ile	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	
65				70						75				80		
gtc	tac	ctg	caa	atg	aac	agc	tta	aga	gct	gaa	gac	act	ggc	att	tat	288
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	
				85					90					95		
CDR3																
tac	tgt	ggg	gct	ctg	ggc	ctt	gac	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	ctc	336
Tyr	Cys	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	
			100					105					110			
aca	gtc	tcc	tcg													348
Thr	Val	Ser	Ser													
			115													

FIG. 2

Secuencia de nucleótidos/aminoácidos de VL de 8B5.3.4

gac att cag atg aca cag tct cca tcc tcc cta ctt gcg gcg ctg gga	48														
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly															
1 5 10 15															
CDR1															
gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gaa att agt ggt tac	96														
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr															
20 25 30															
CDR2															
tta agc tgg ctt cag cag aaa cca gat gga act att aaa cgc ctg atc	144														
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile															
35 40 45															
CDR3															
tac gcc gca tcc act tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc	192														
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly															
50 55 60															
agt gag tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agt ctt gag tct	240														
Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser															
65 70 75 80															
CDR3															
gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat ttt agt tat ccg ctc	288														
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu															
85 90 95															
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	321														
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys															
100 105															

FIG. 3

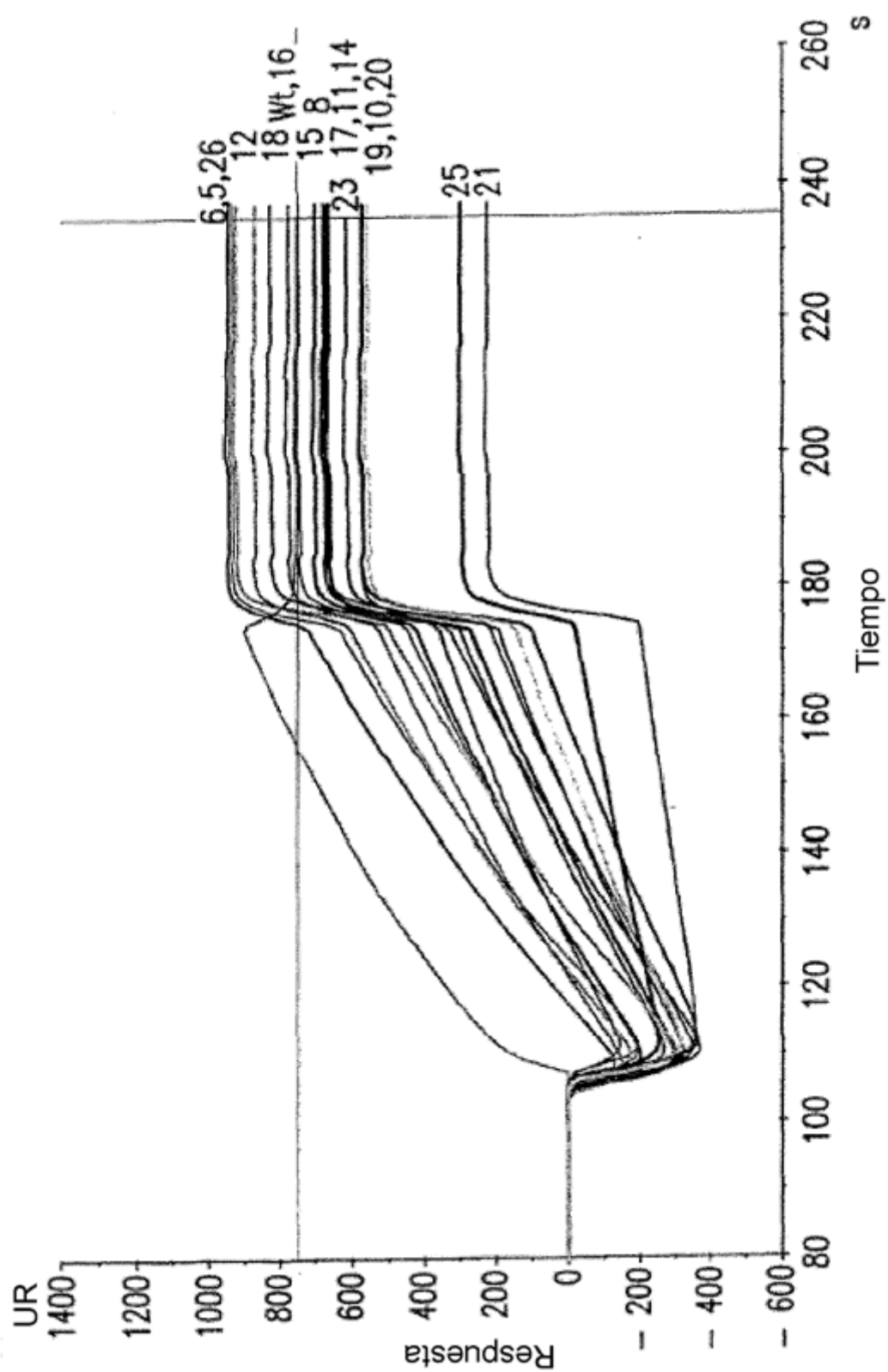


FIG. 4

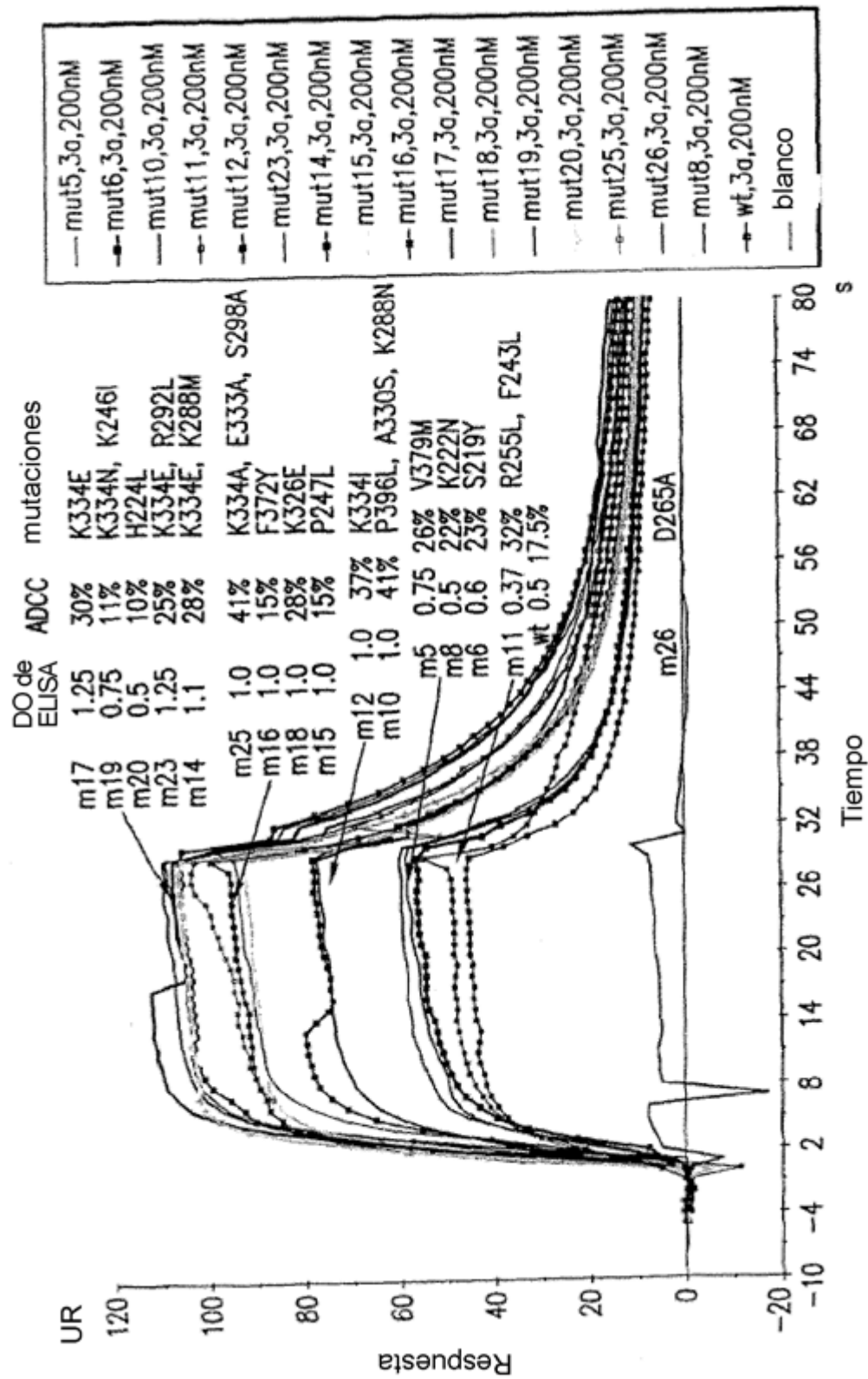


FIG. 5

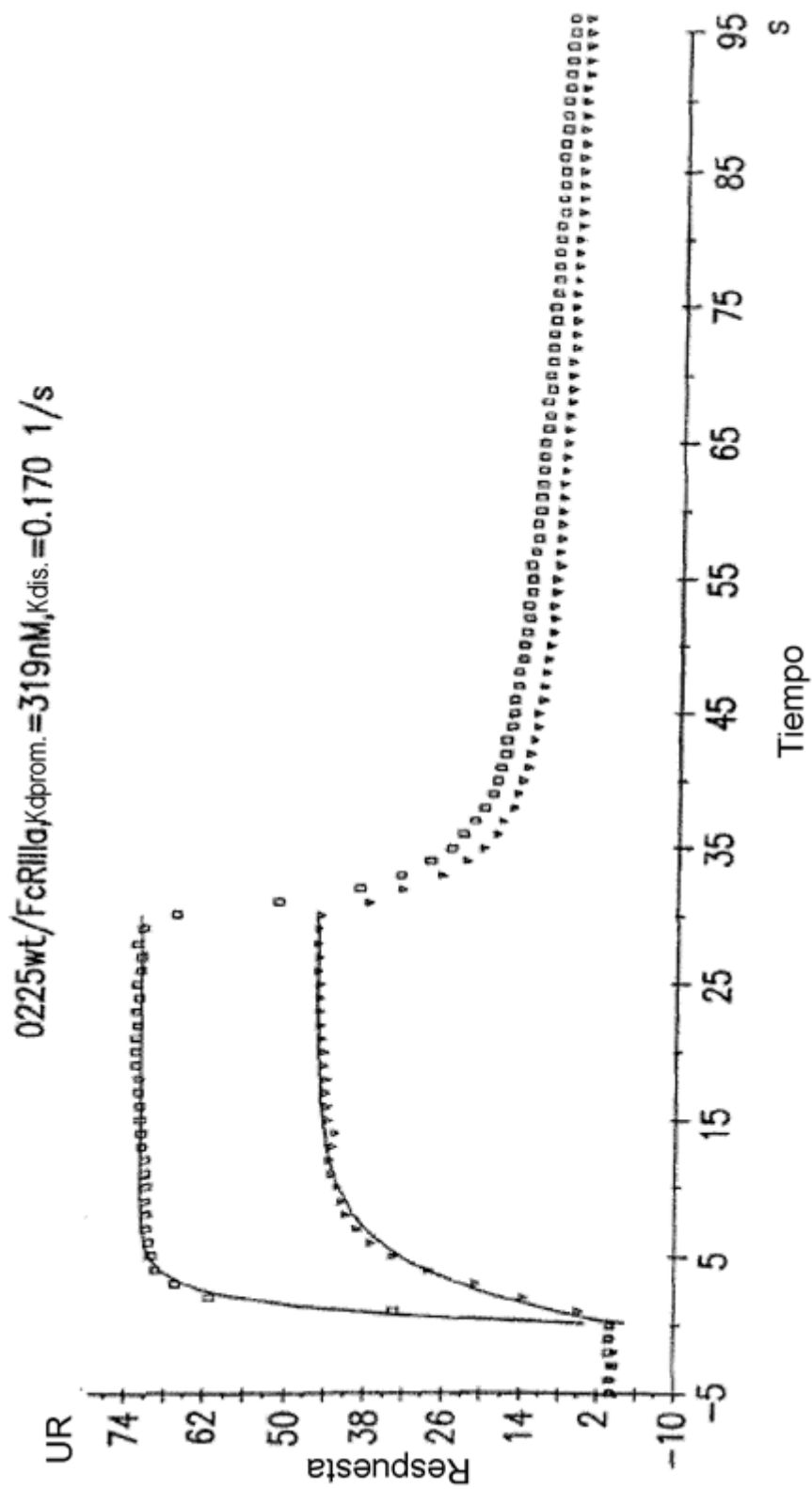


FIG. 6A

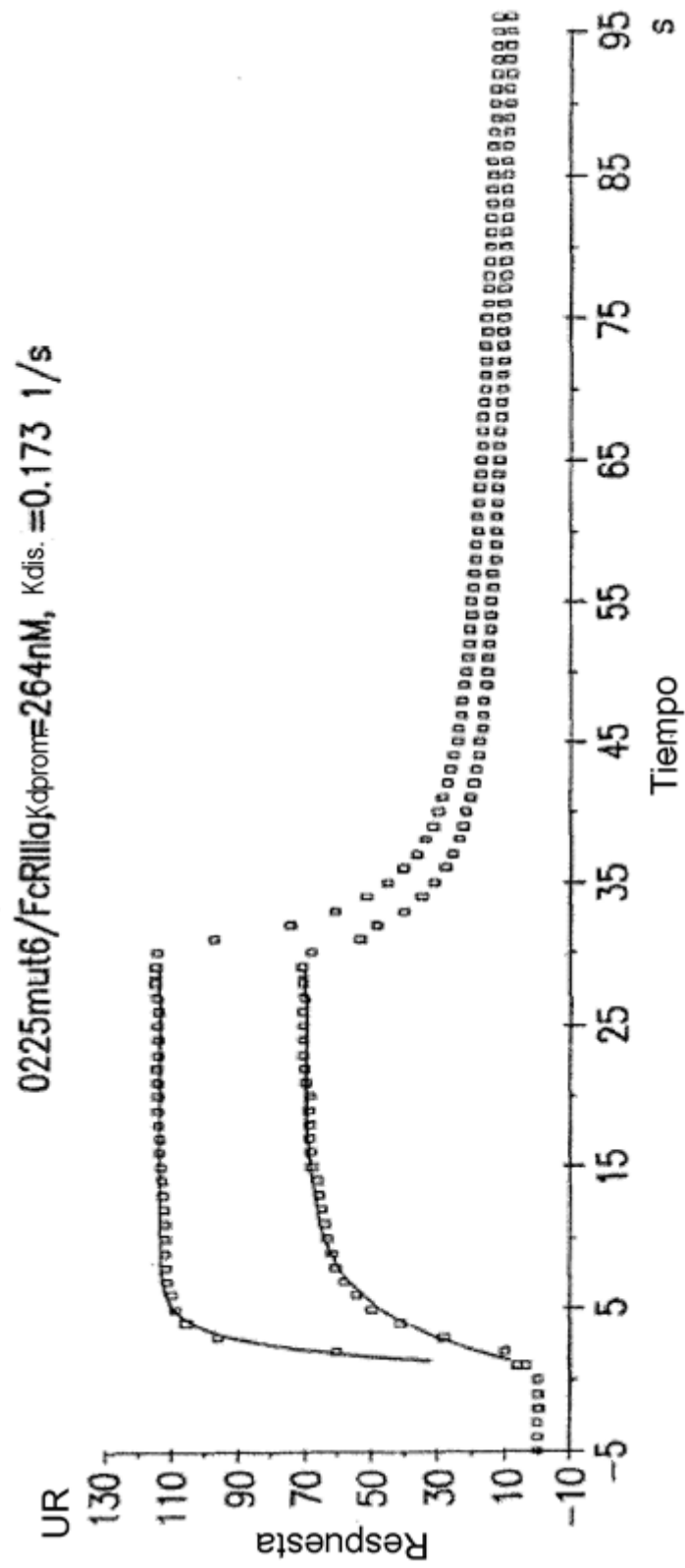


FIG. 6B

0225mut10/FcR1IIa_JK_{dprom}=128nM_{Kdis}=0.115 1/s

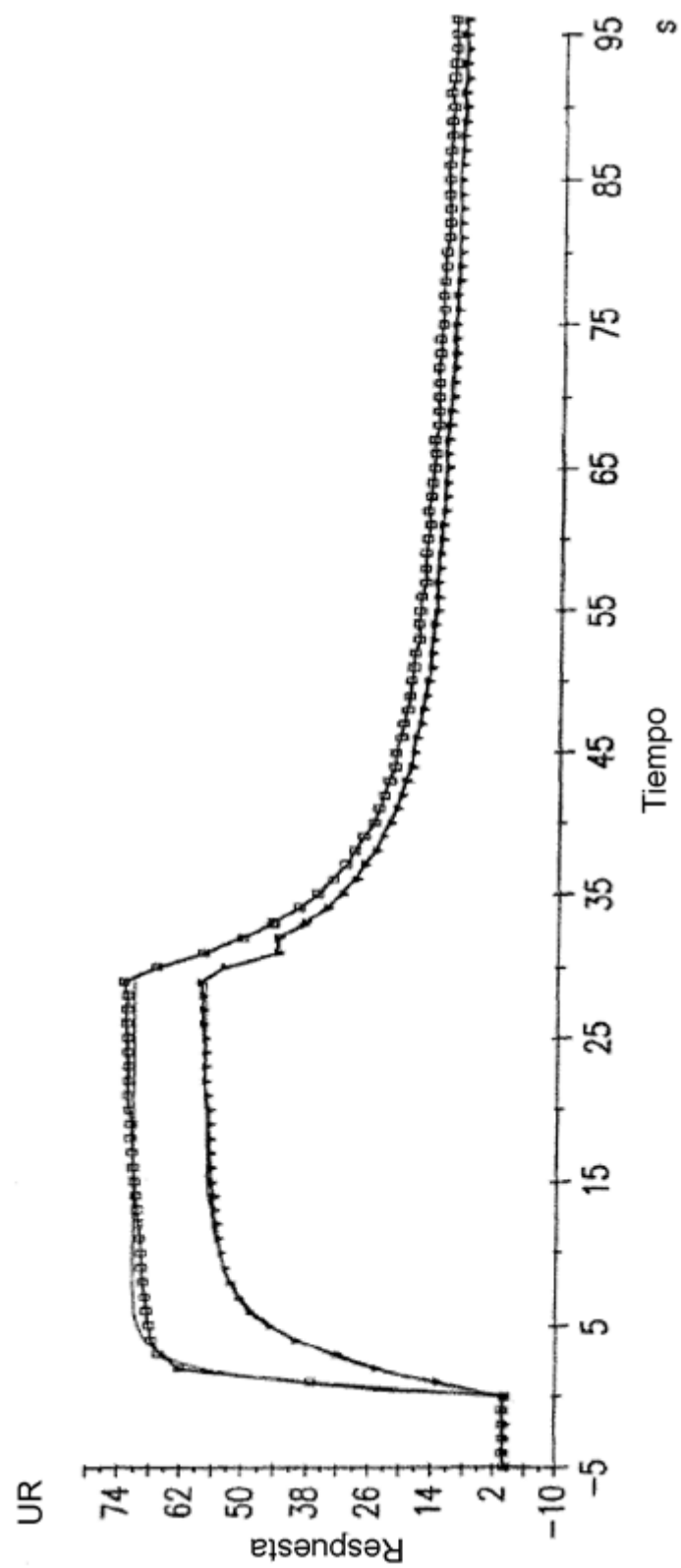


FIG. 6C

0225mut11FcRIIIaKdprom=91.8nM, Kdis.=0.073 1/s

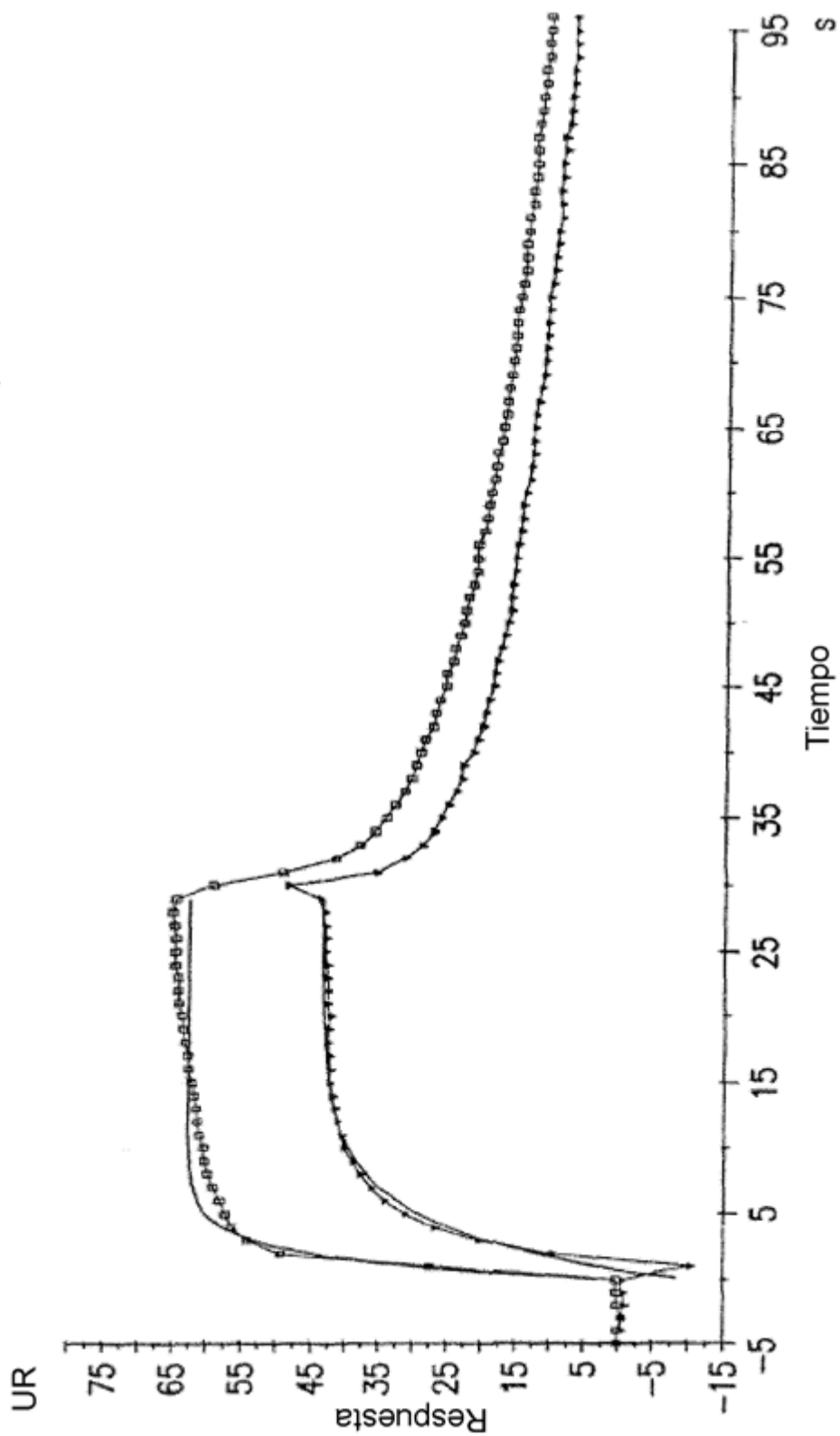


FIG. 6D

0225mut18/FcR1IIa, $K_{\text{dprom}}=92\text{nM}$, $K_{\text{dis}}=0.112\text{ 1/s}$

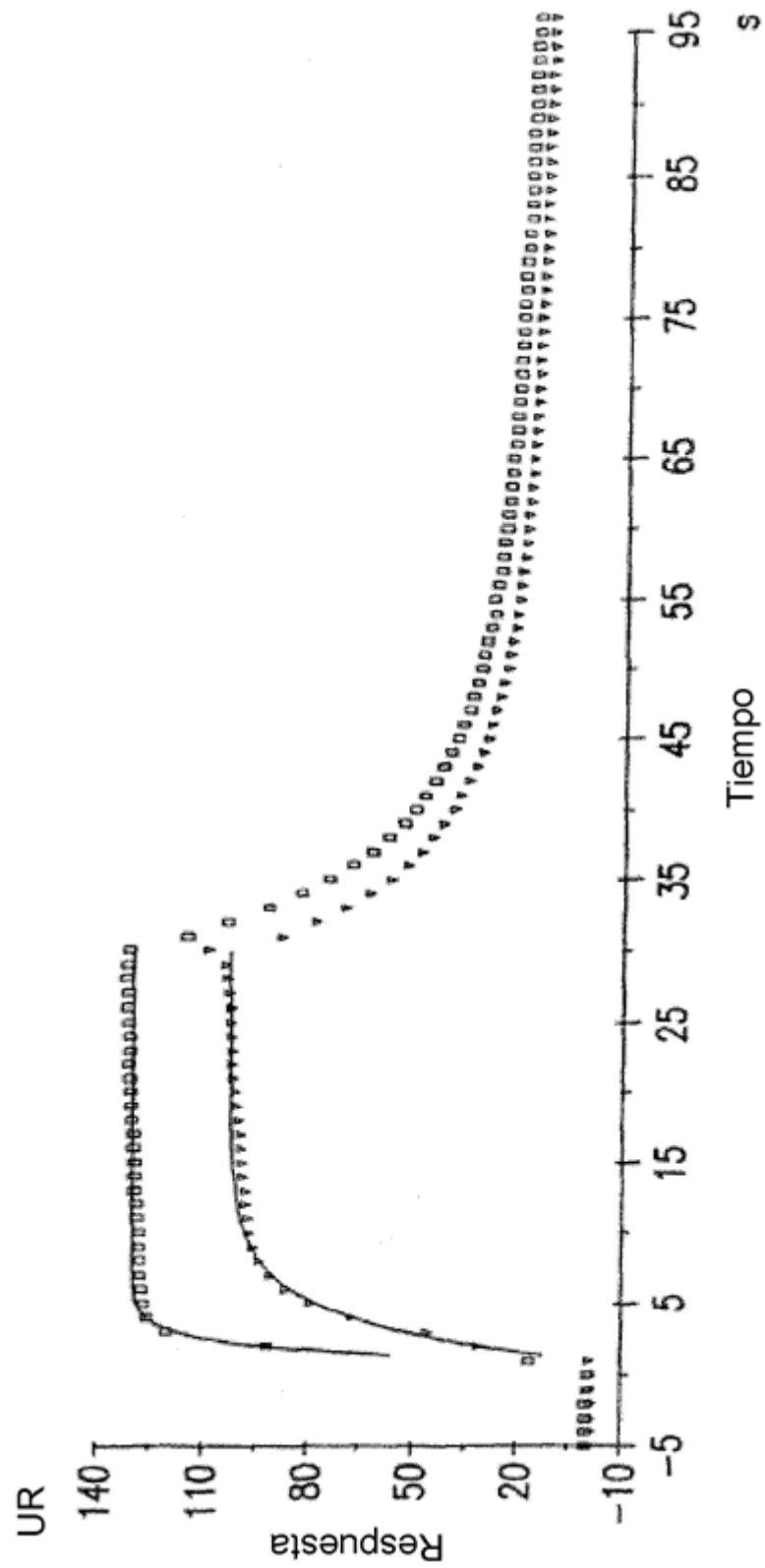


FIG. 6E

0225mut14/FcRIIIa, $K_{dprom}=75.4\text{ nM}$, $K_{dis}=0.1\text{ 1/s}$

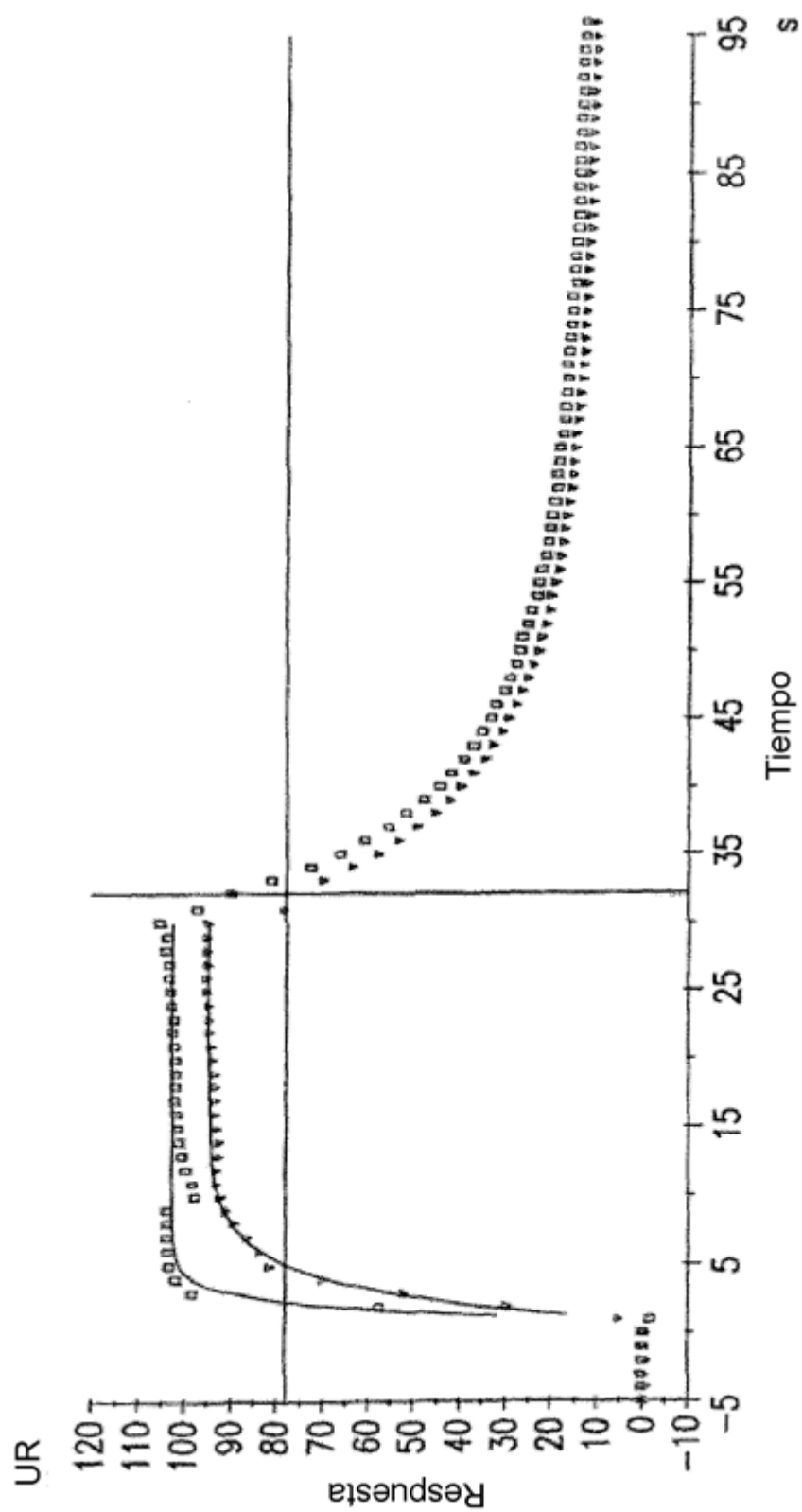


FIG. 6F

0225mut16/FcR1IIa₁ K_{dprom}=84.8nM, K_{dis}=0.133 1/s

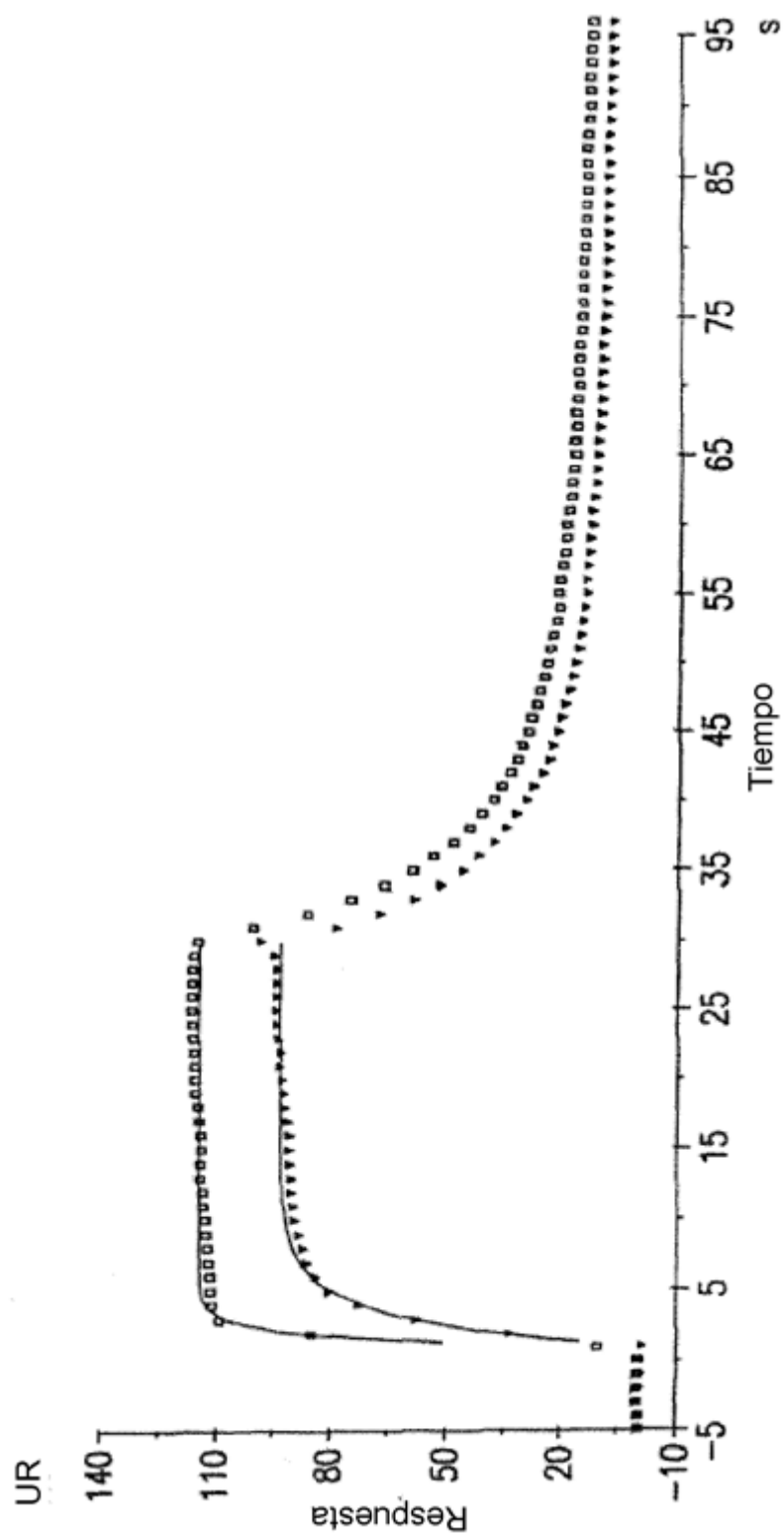


FIG. 6G

0225mut19/FcR11a $K_{dprom}=100nM$, $K_{dis}=0.120$ 1/s

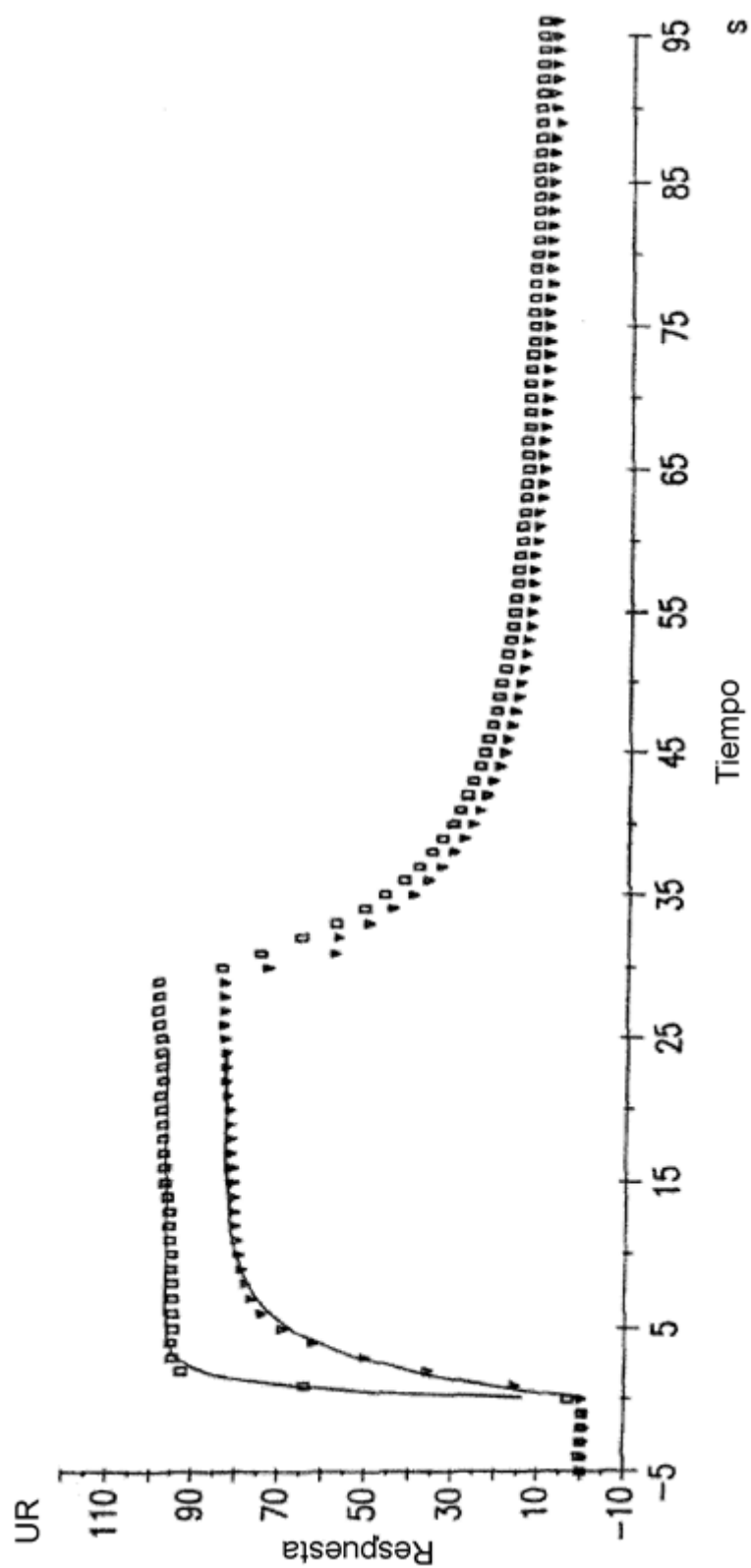


FIG. 6H

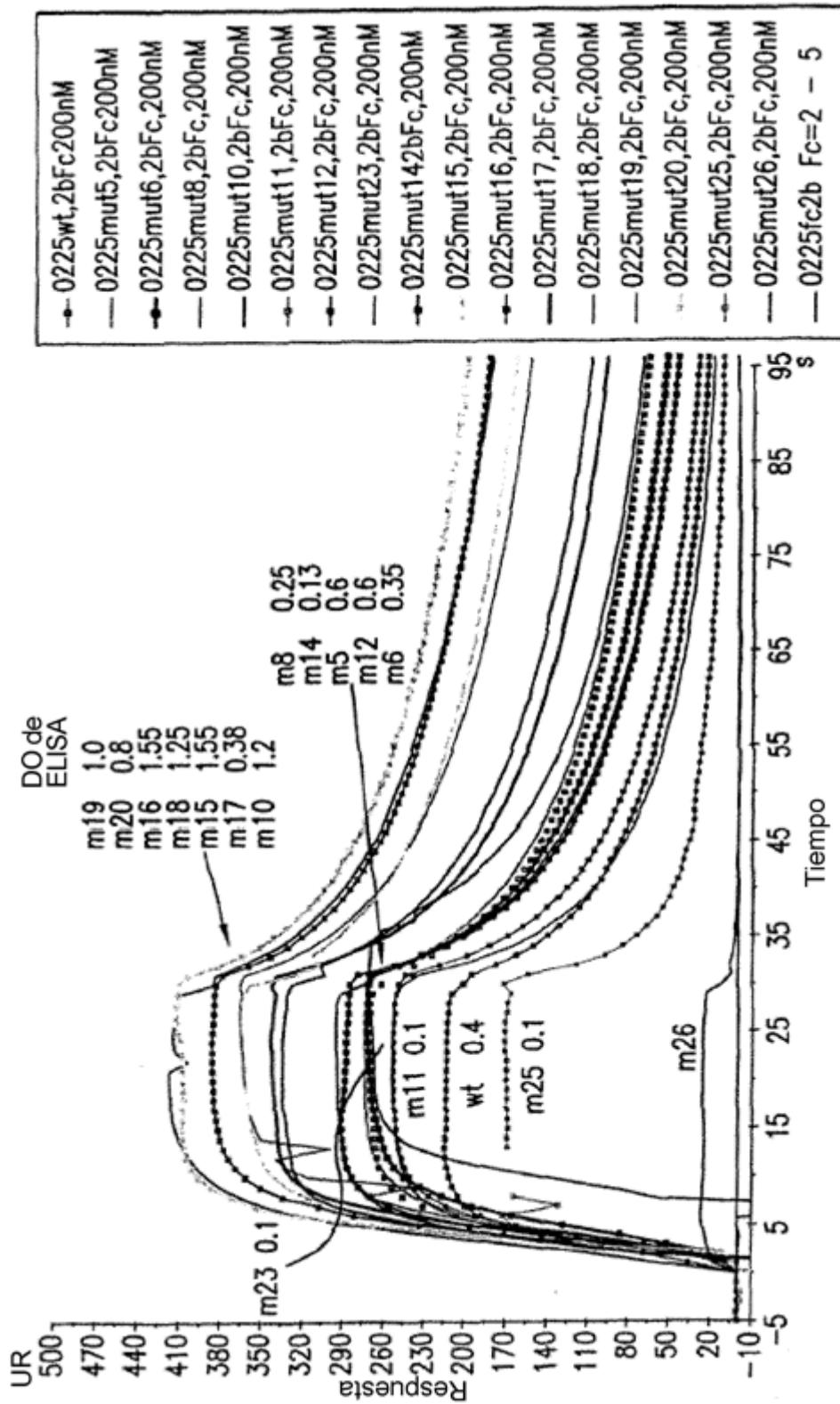


FIG. 7

0225wt/FcRIIb, $K_{d\text{prom}} = 61.4 \text{ nM}$, $K_{d\text{dis}} = 0.0847 \text{ 1/s}$

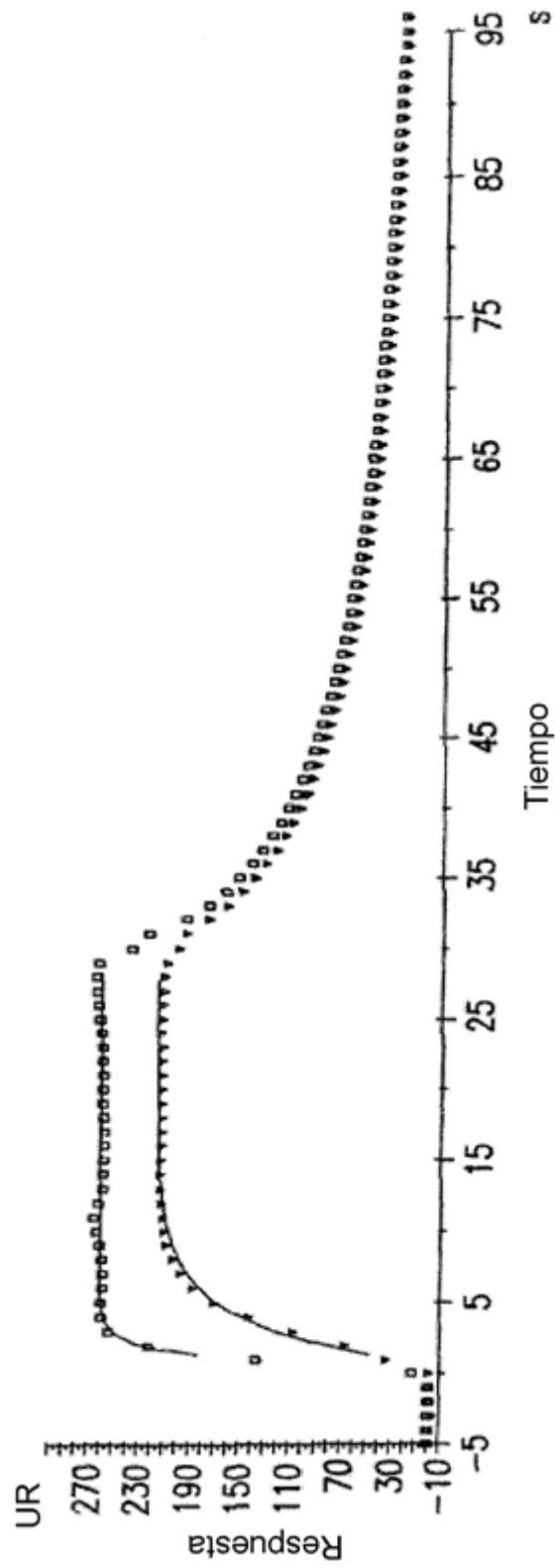


FIG. 8A

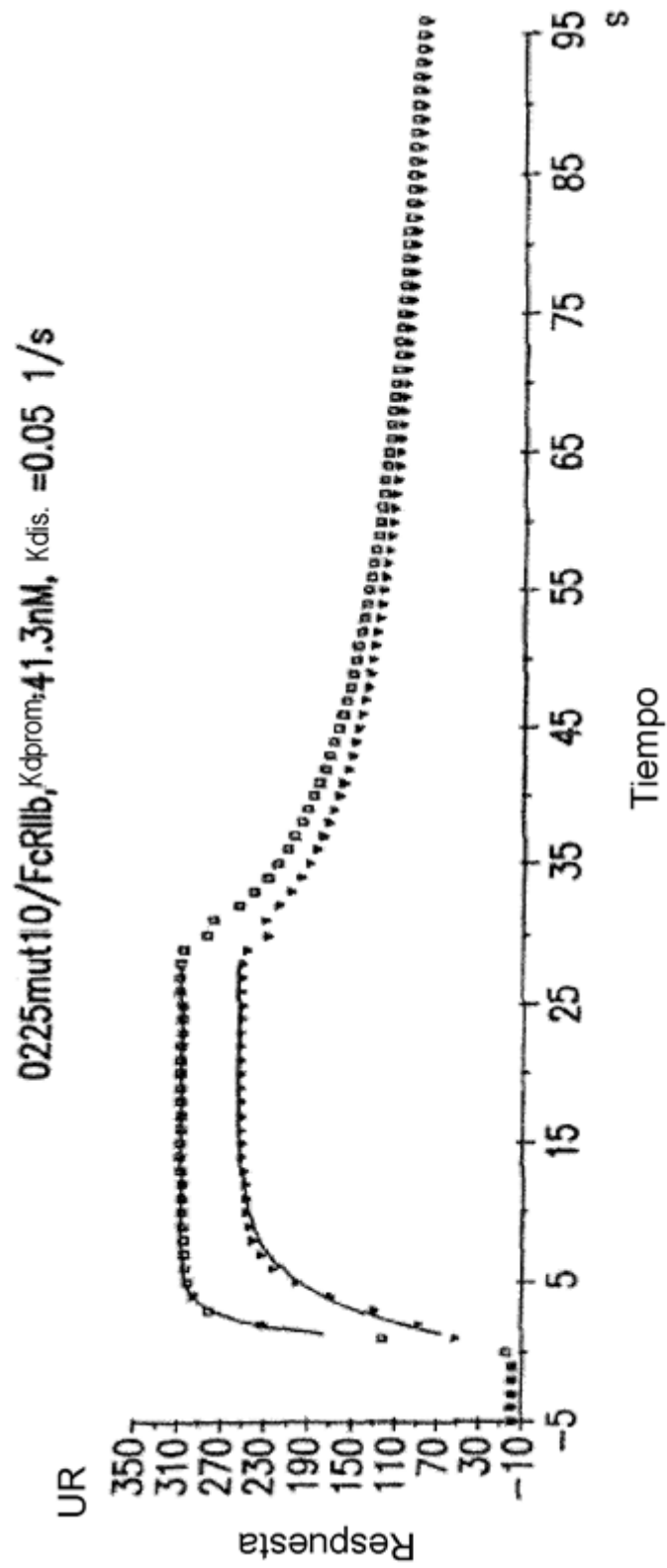


FIG. 8B

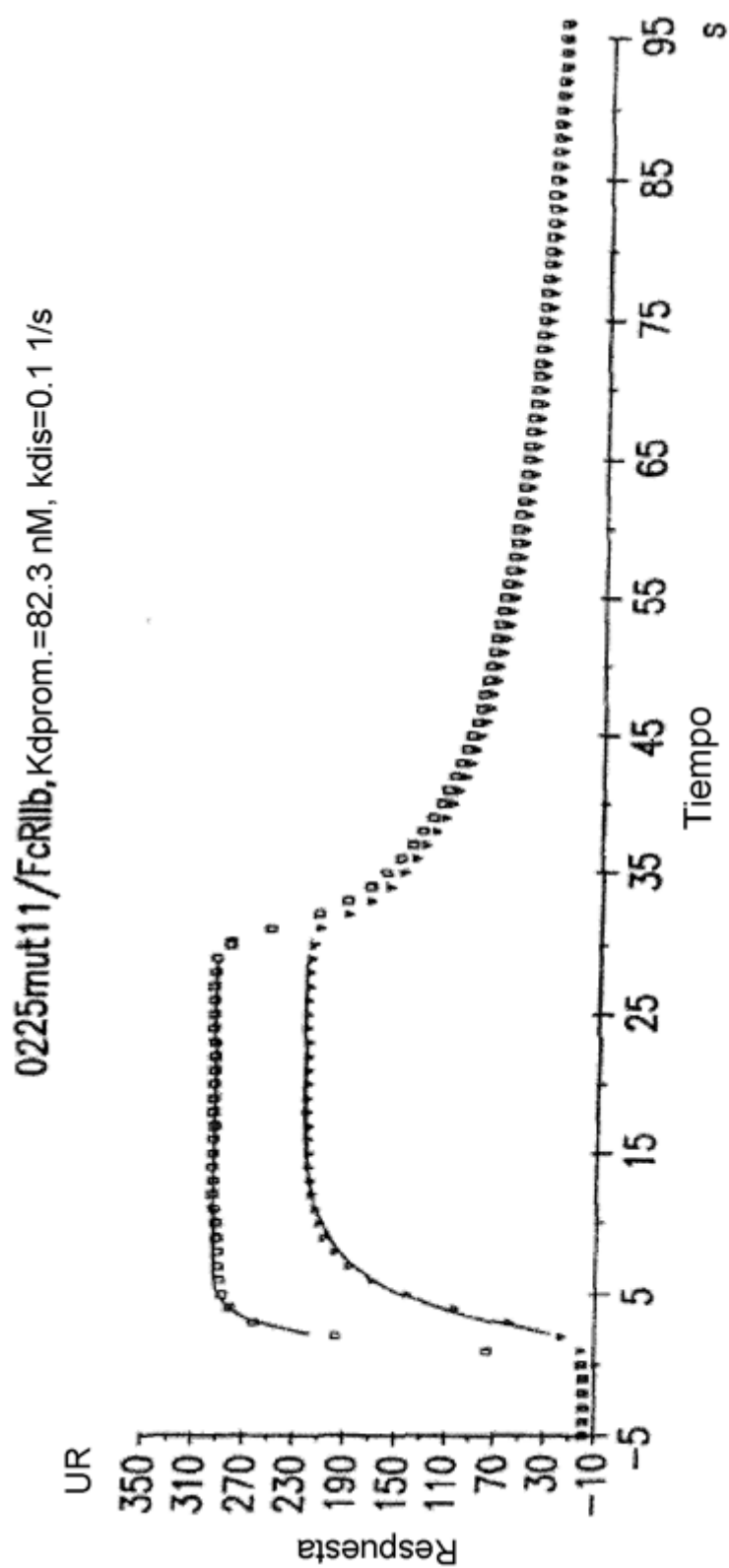


FIG. 8C

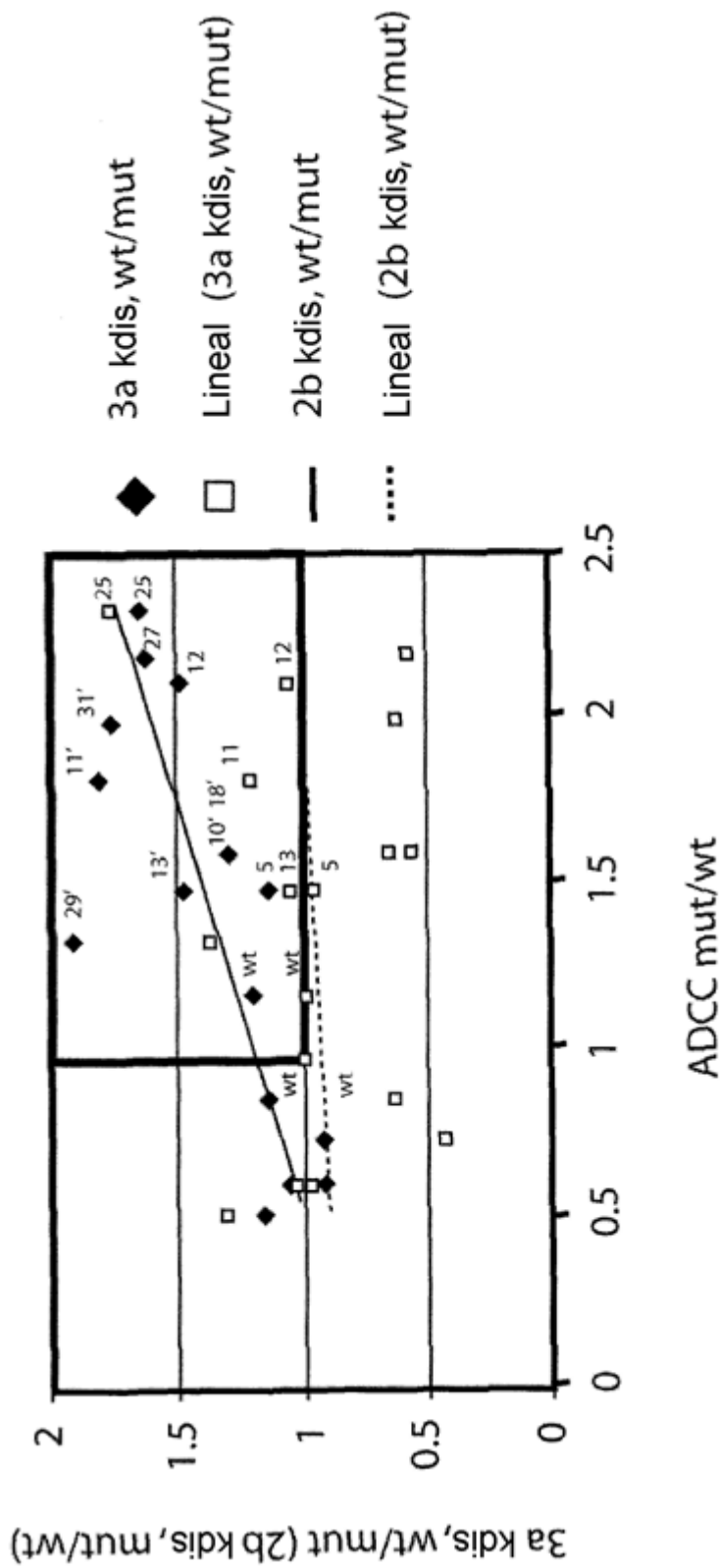


FIG. 9

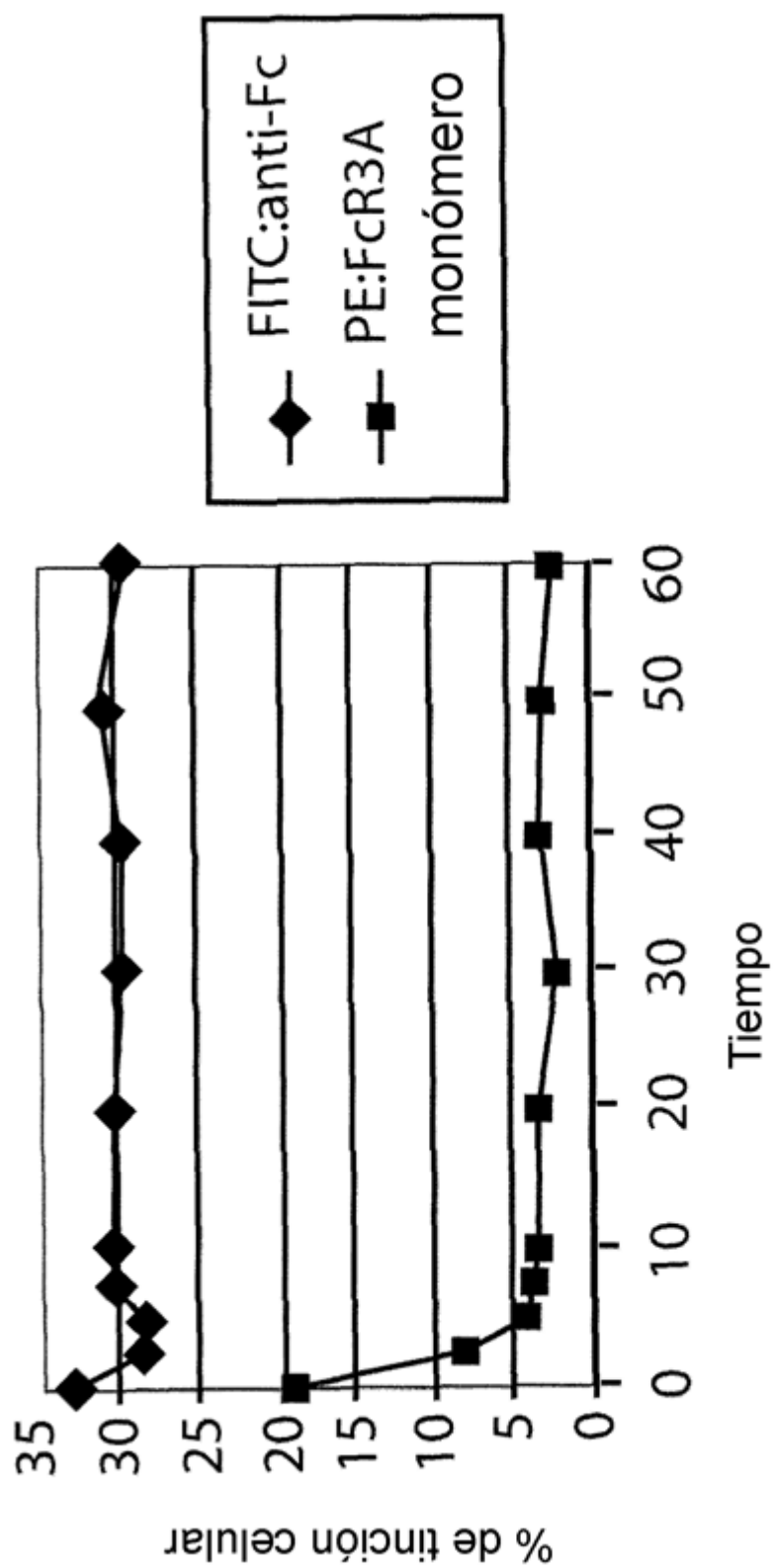
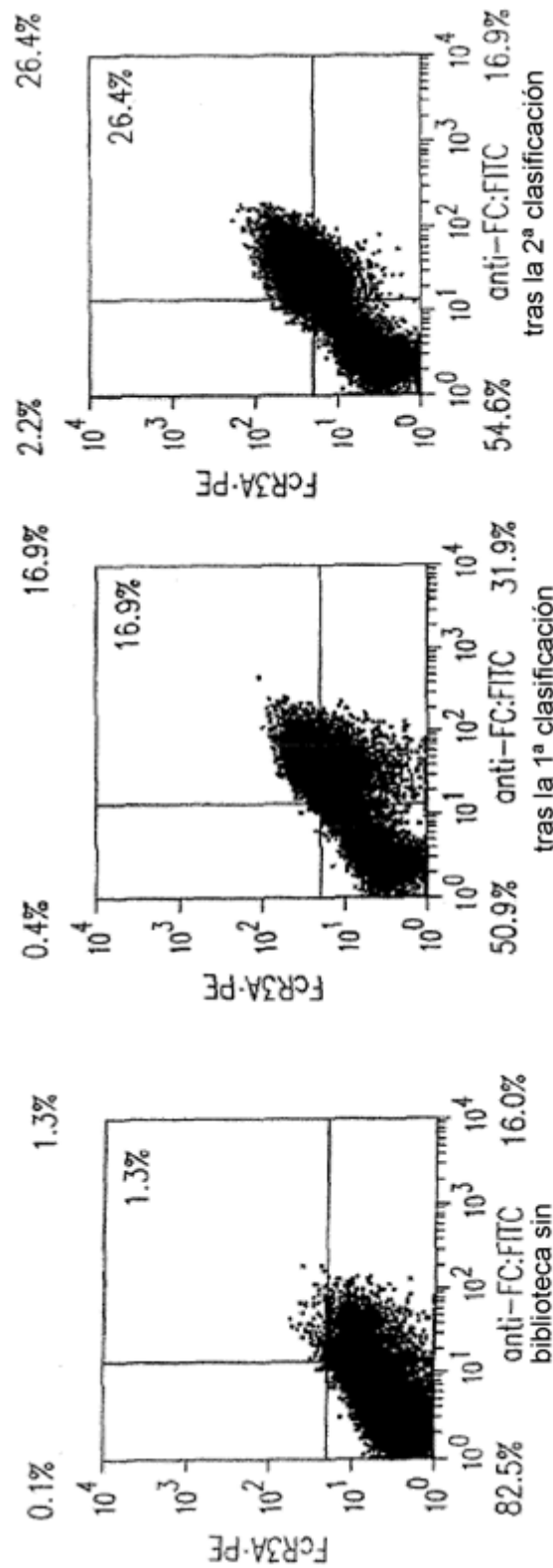


FIG. 10



3aLAVI(V158) P051

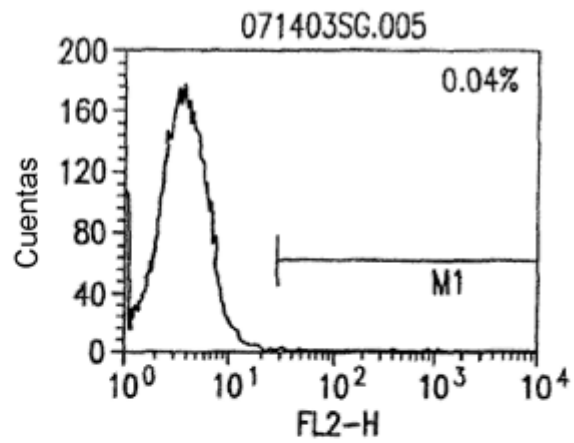


FIG. 12A-1

3aLAVI(V158) P051

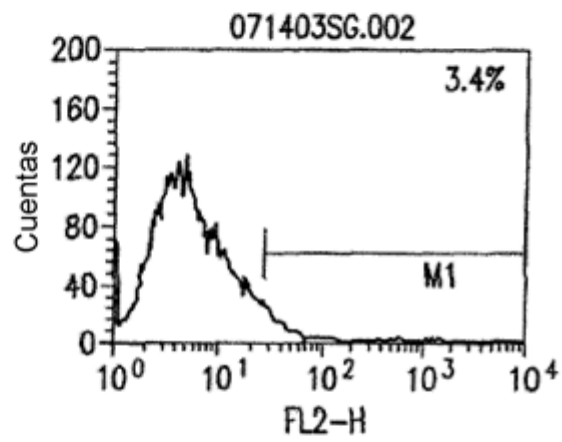


FIG. 12A-2

3aLAVI(V158) P051

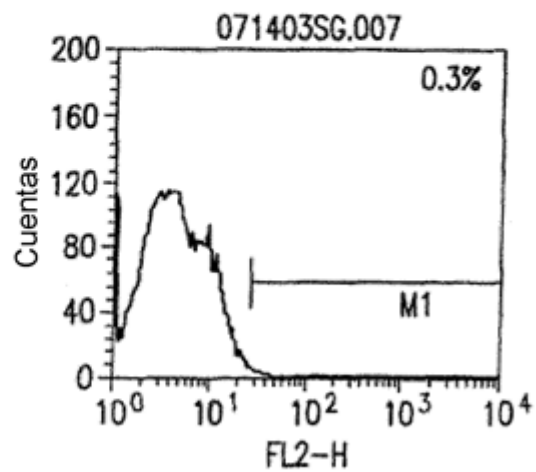


FIG. 12A-3

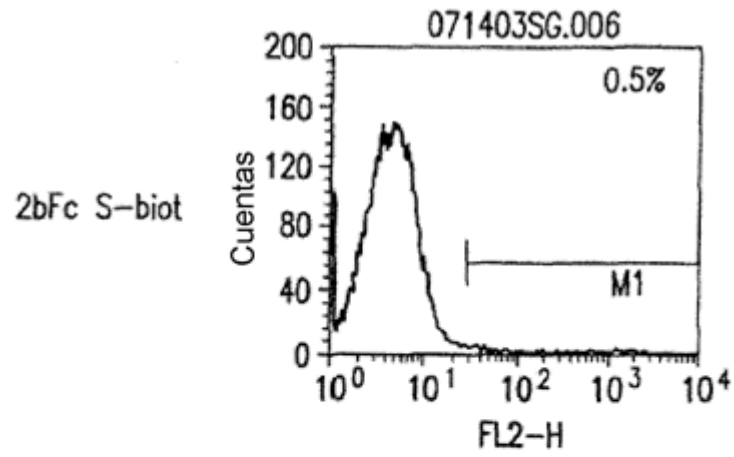


FIG. 12A-4

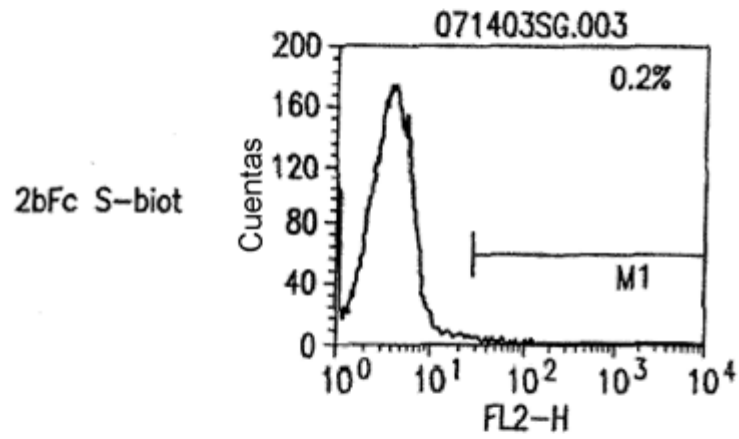


FIG. 12A-5

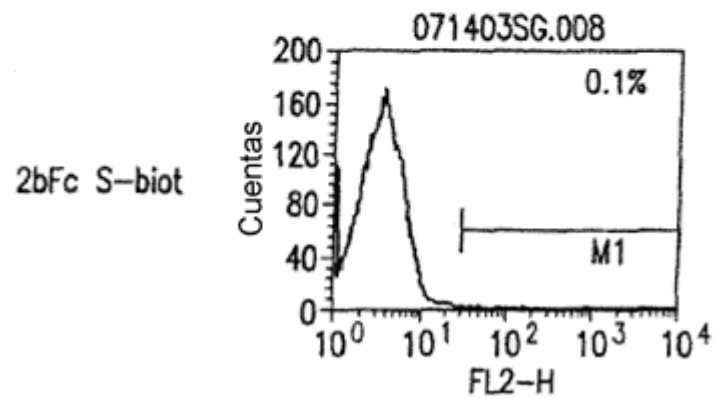


FIG. 12A-6

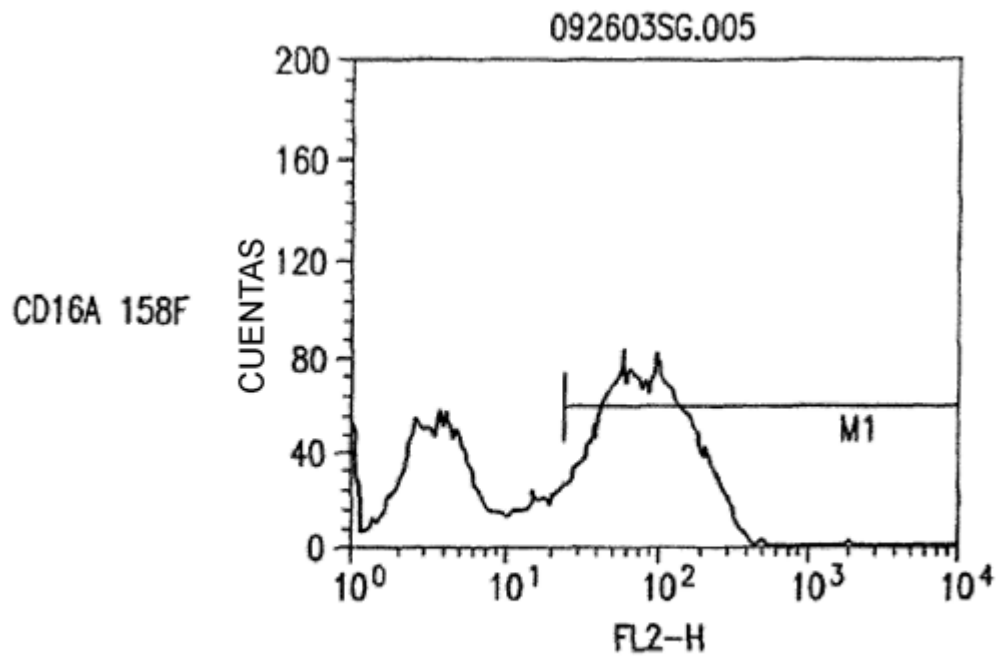


FIG. 12B-1

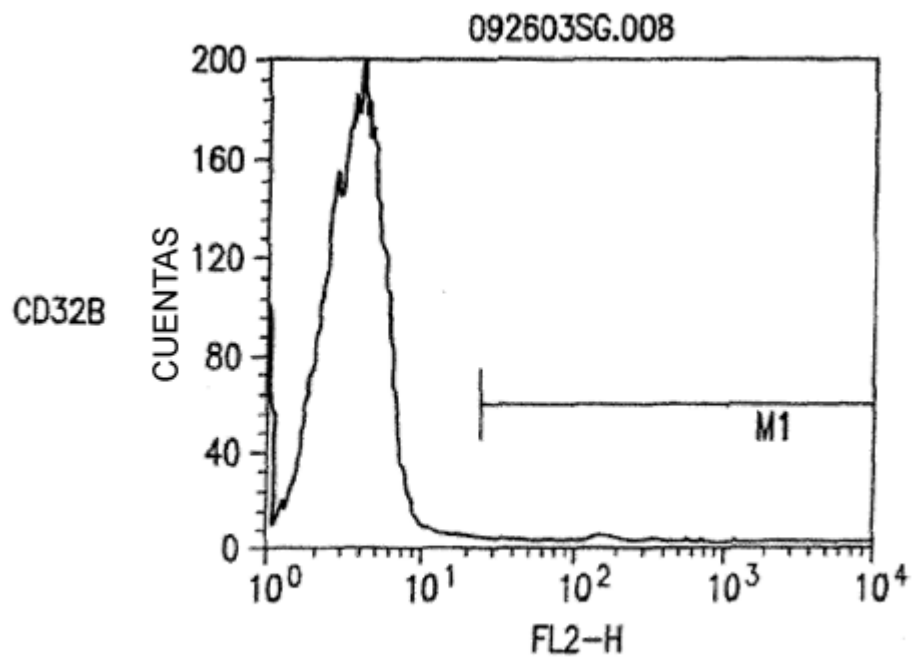


FIG. 12B-2

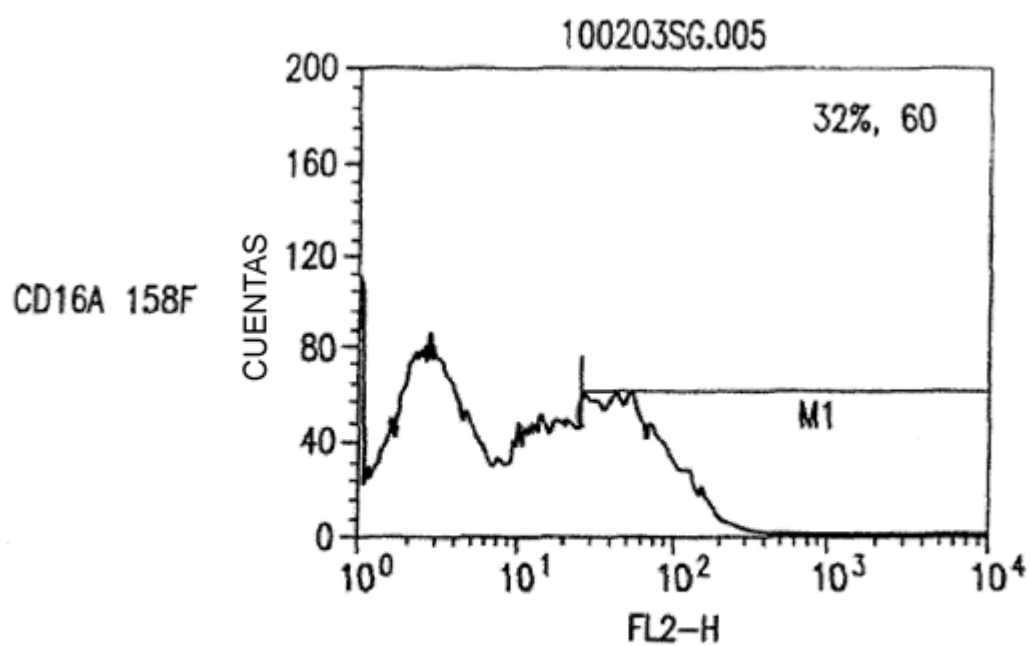


FIG. 12B-3

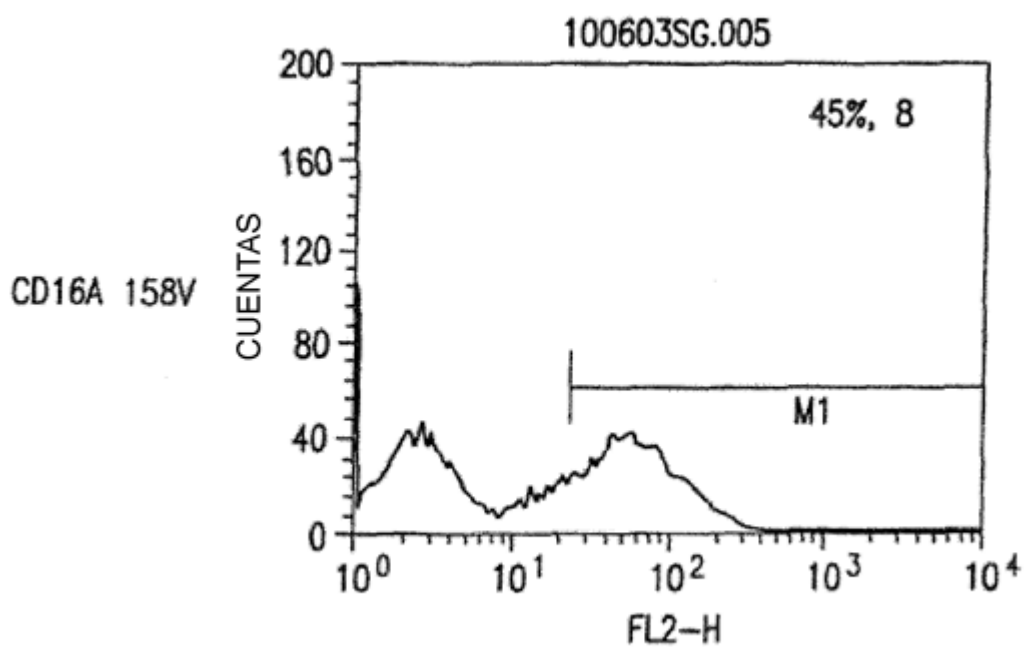


FIG. 12B-4

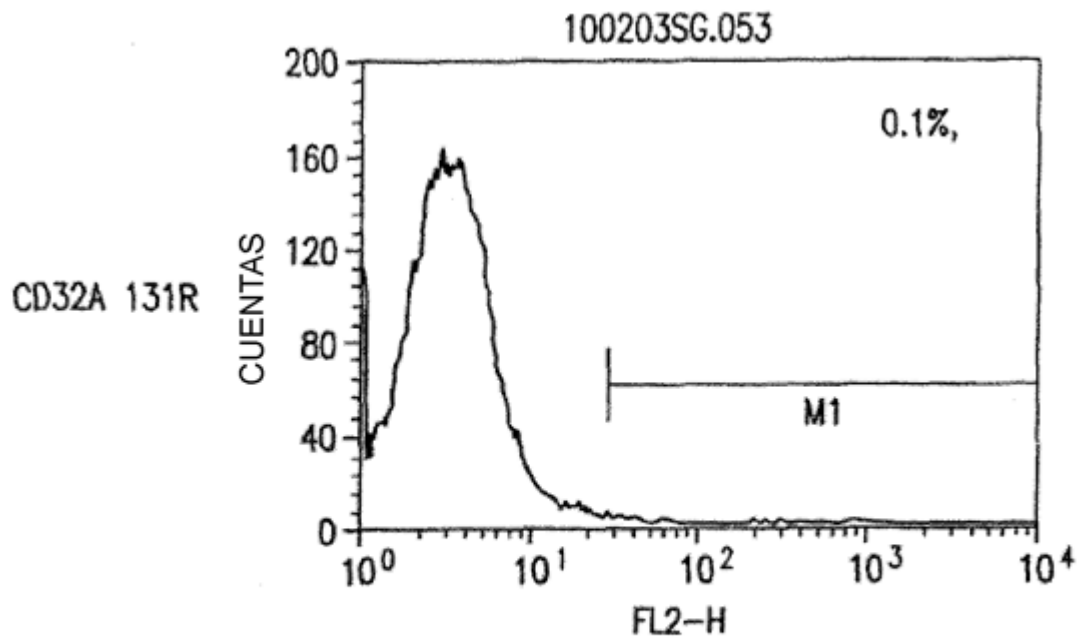


FIG. 12B-5

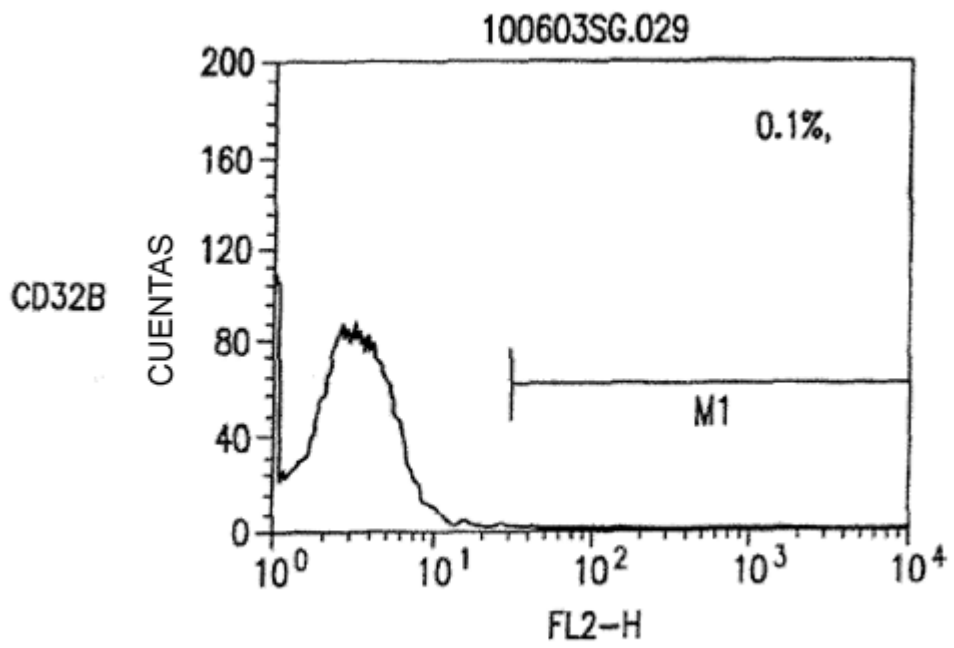


FIG. 12B-6

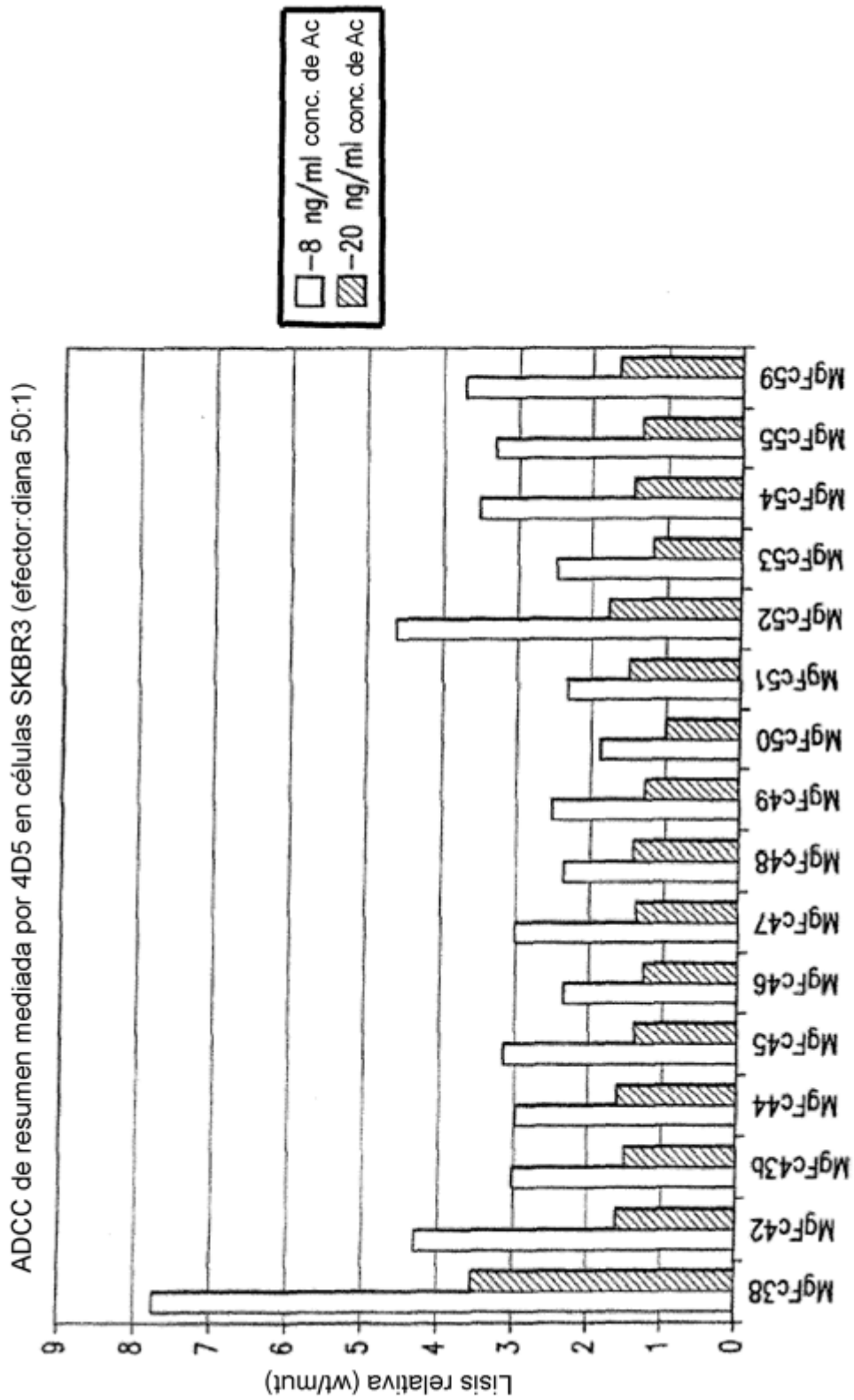


FIG. 13

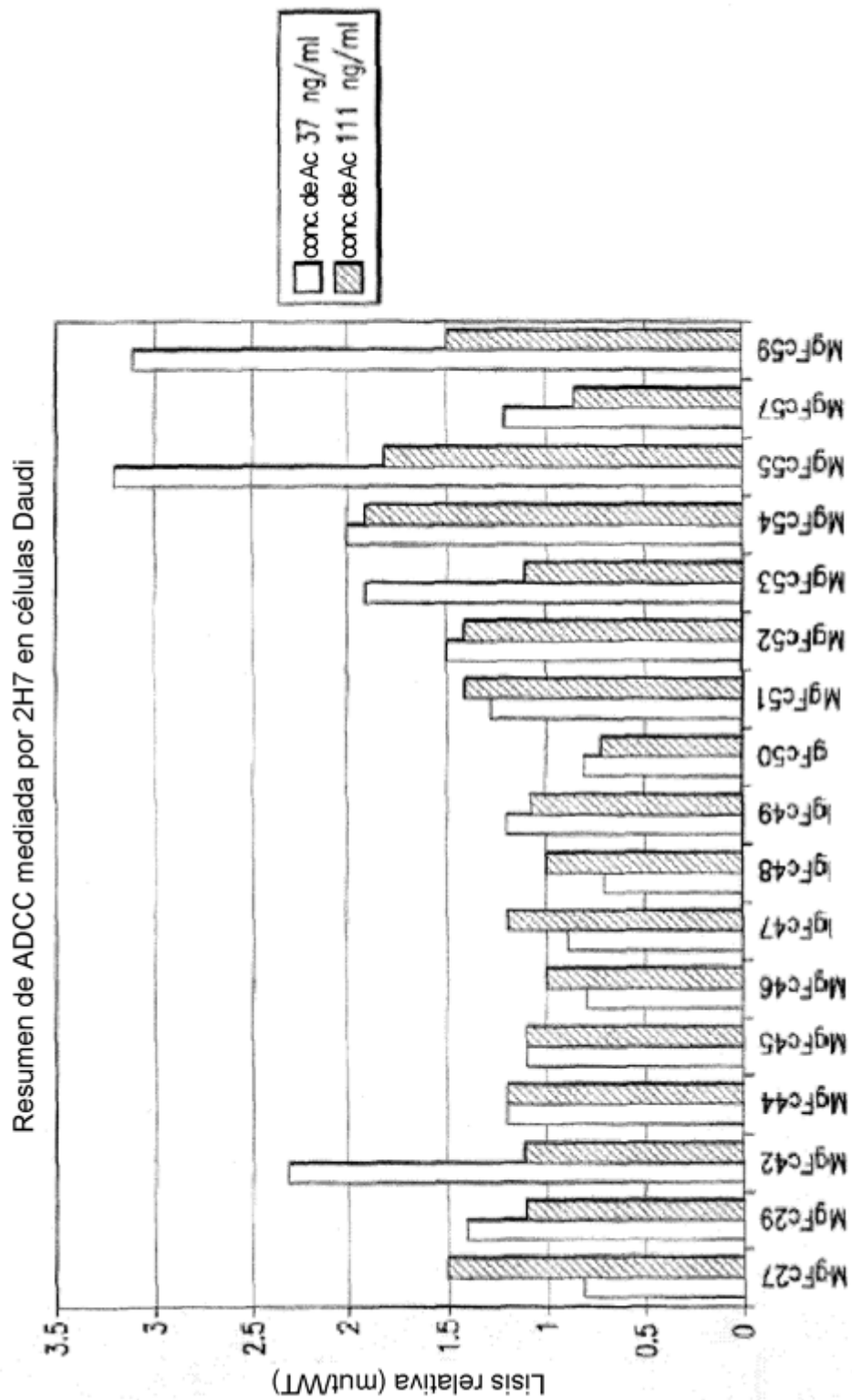
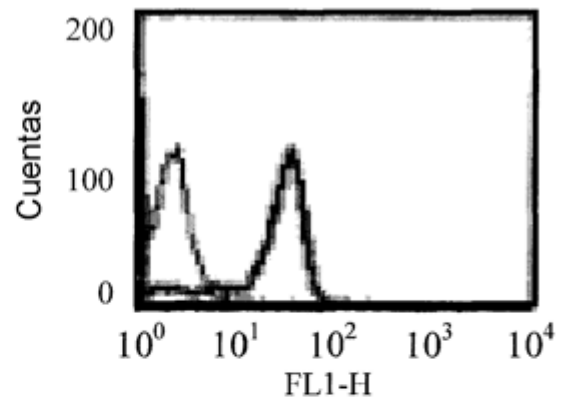
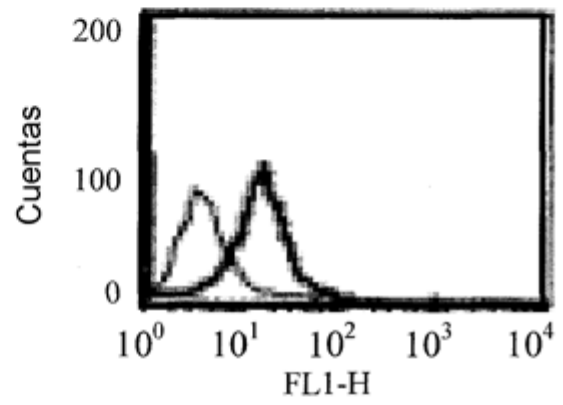


FIG. 14

CD64 Día 0



CD64 Día 8
Condición 1



CD64 Día 8
Condición 2

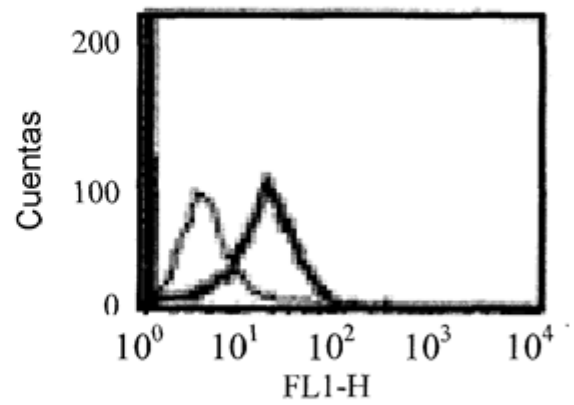
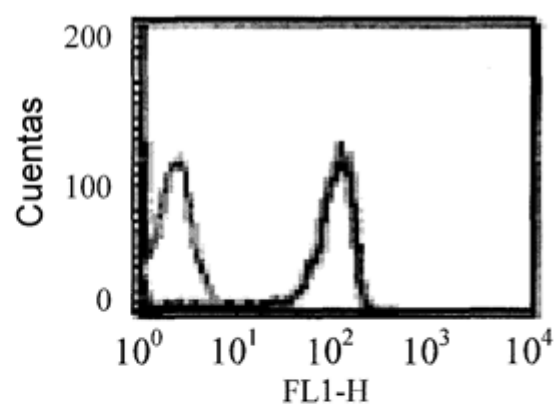
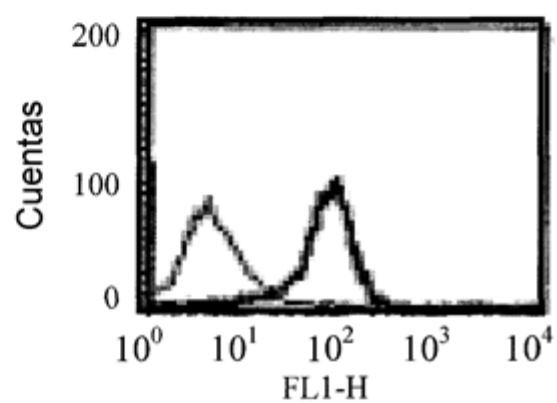


FIG. 15, Panel A

CD32A Día 0



CD32A Día 8
Condición 1



CD32A Día 8
Condición 2

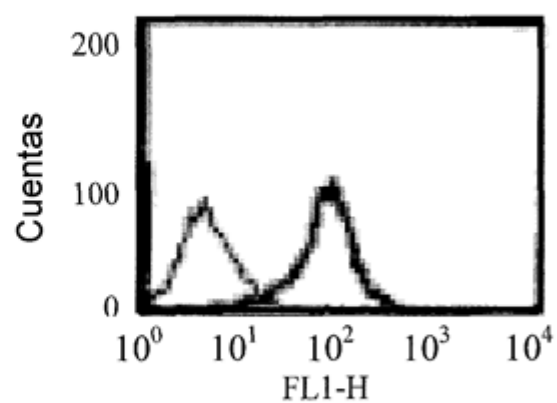
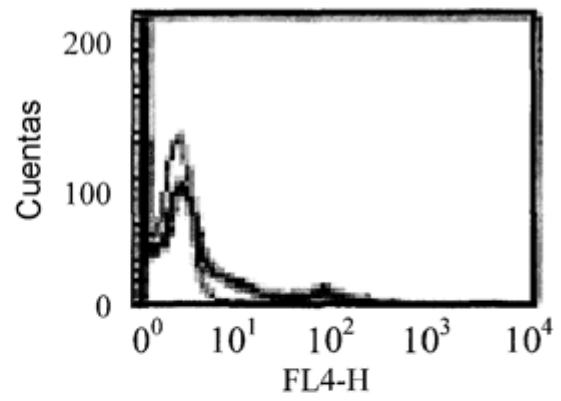
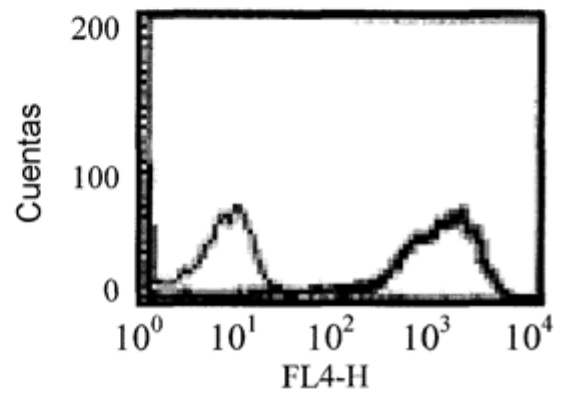


FIG. 15, Panel B

CD32B Día 0



CD32B Día 8
Condición 1



CD32B Día 8
Condición 2

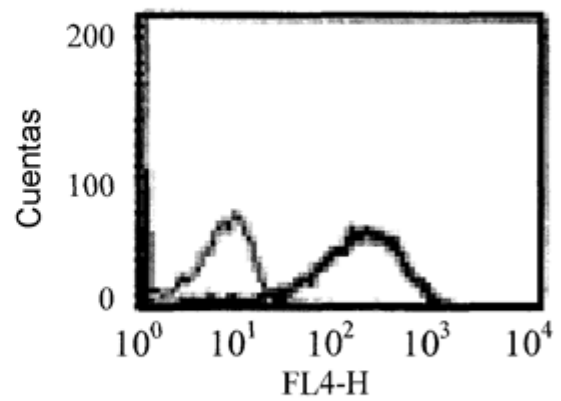
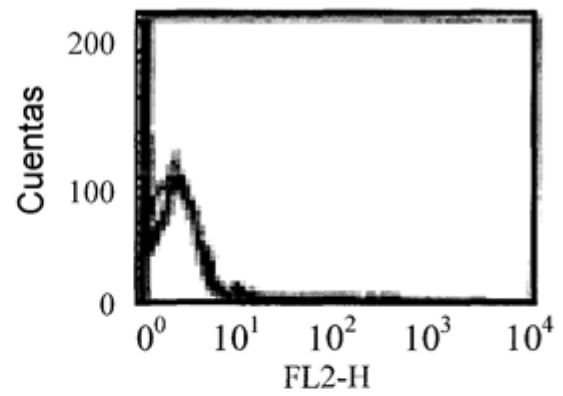
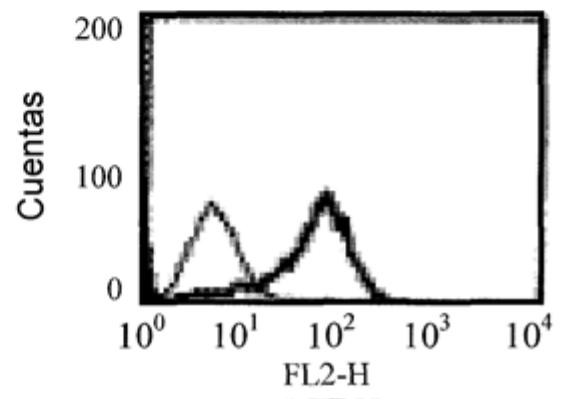


FIG. 15, Panel C

CD16 Día 0



CD16 Día 8
Condición 1



CD16 Día 8
Condición 2

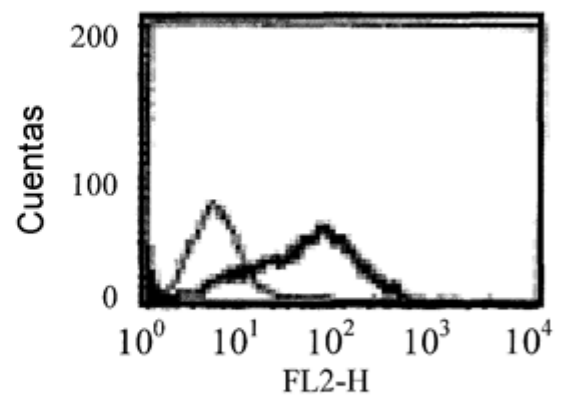


FIG. 15, Panel D

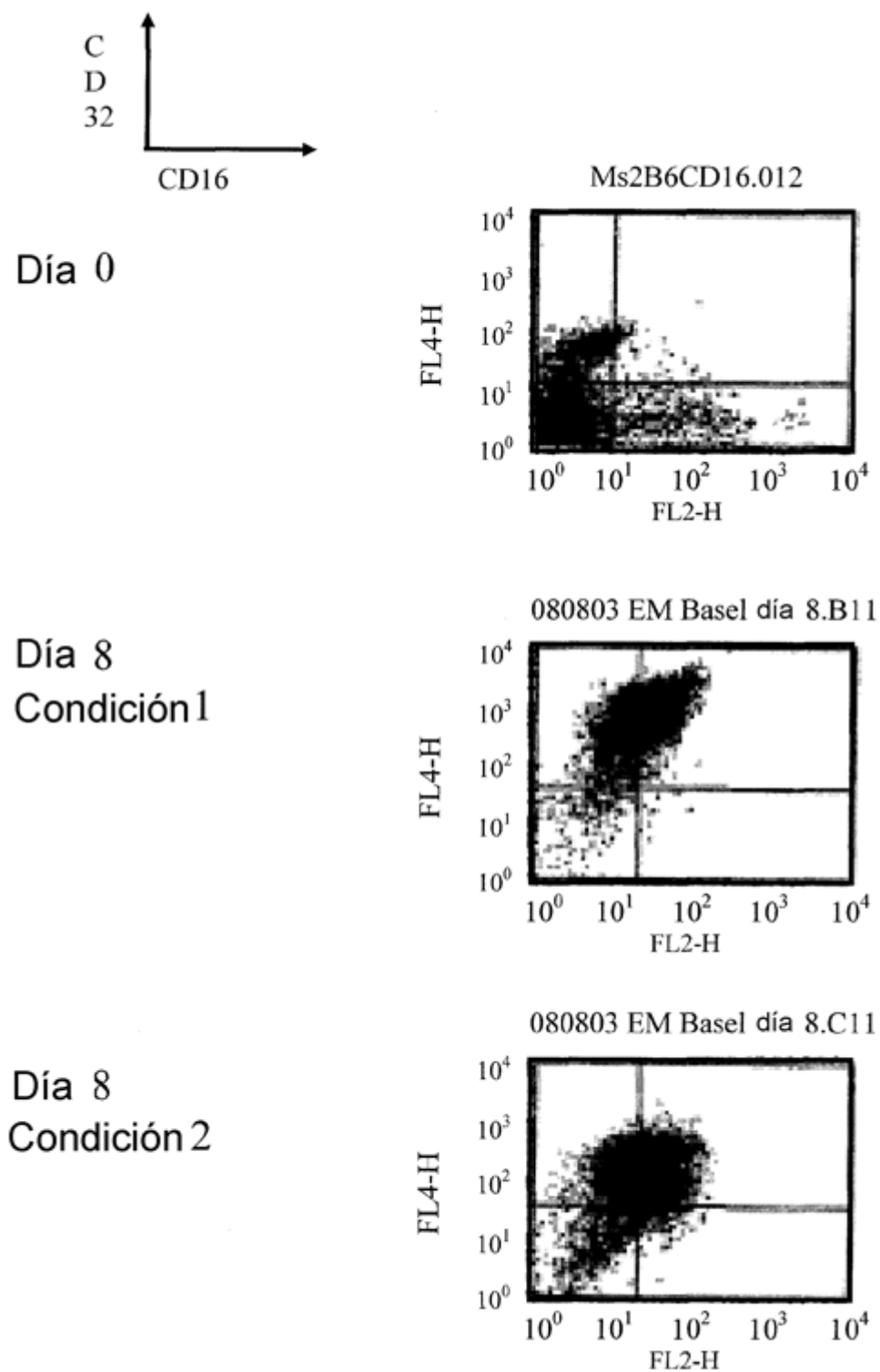


FIG. 15, Panel E

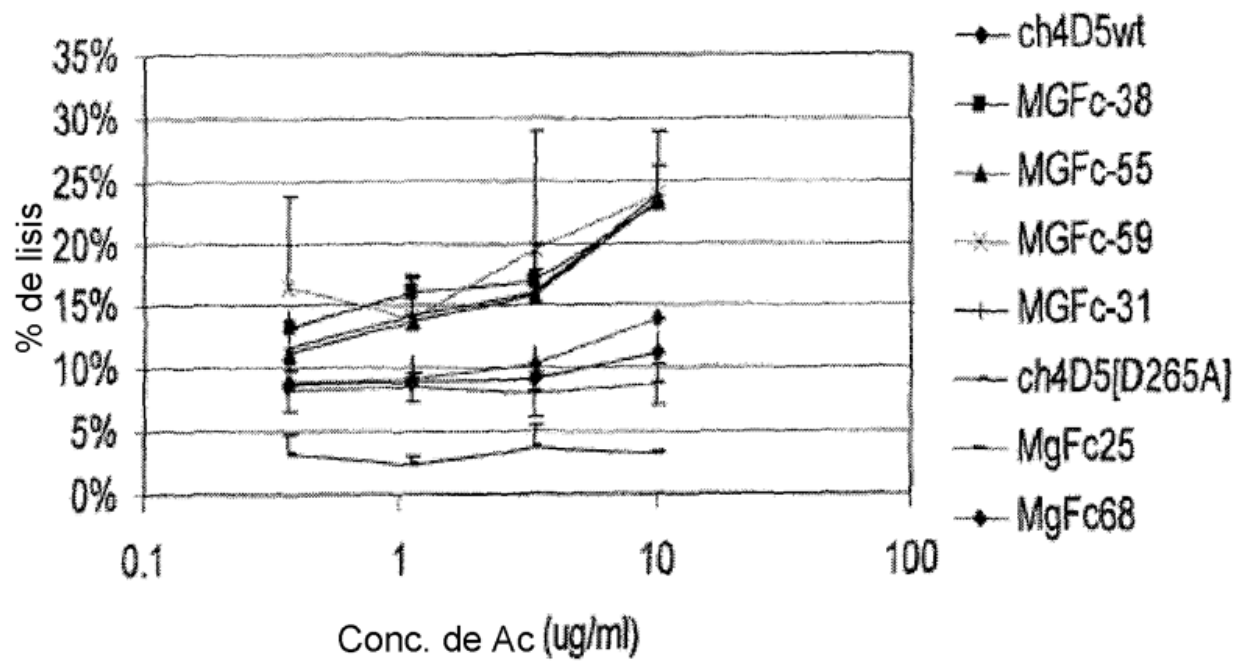


FIG. 16

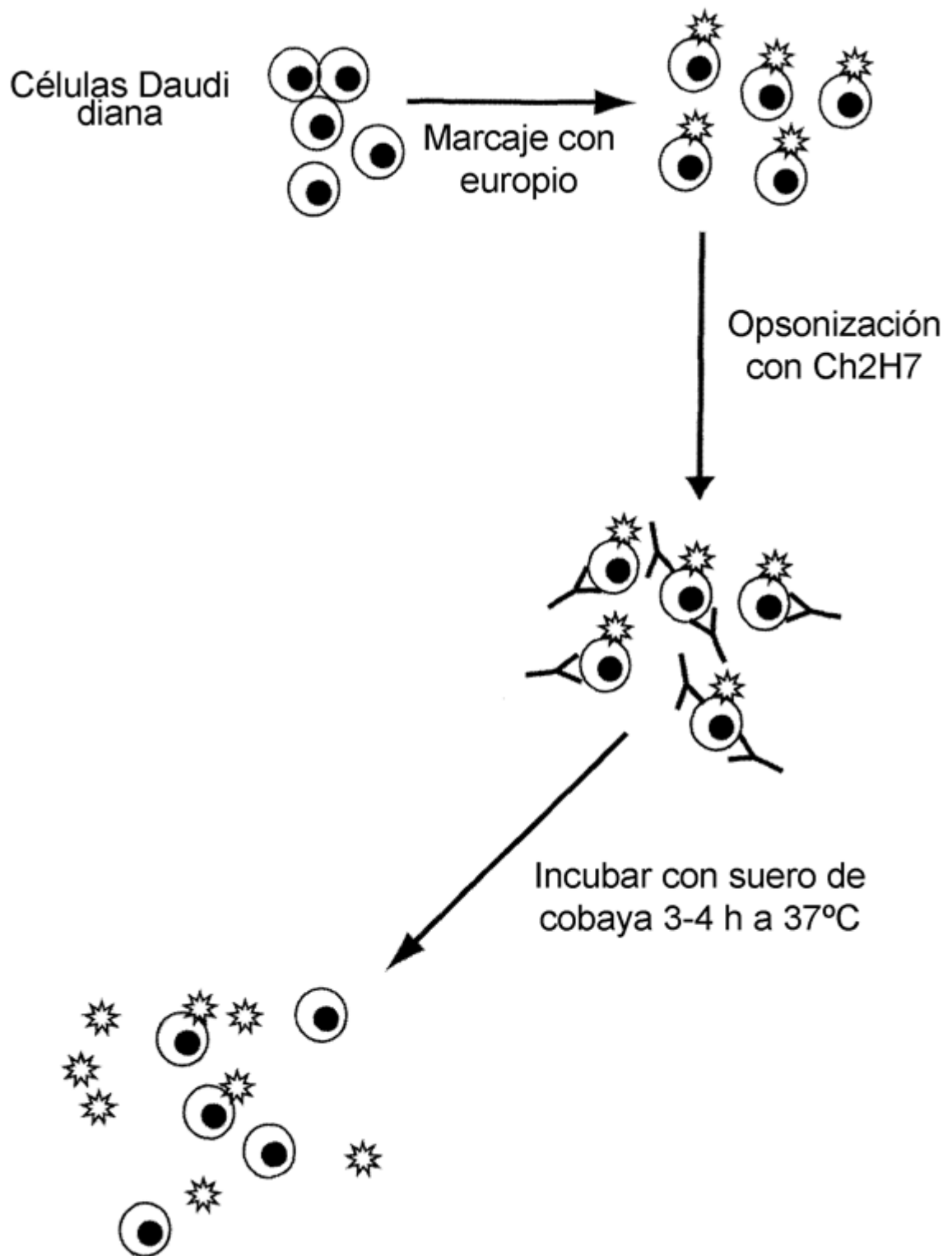
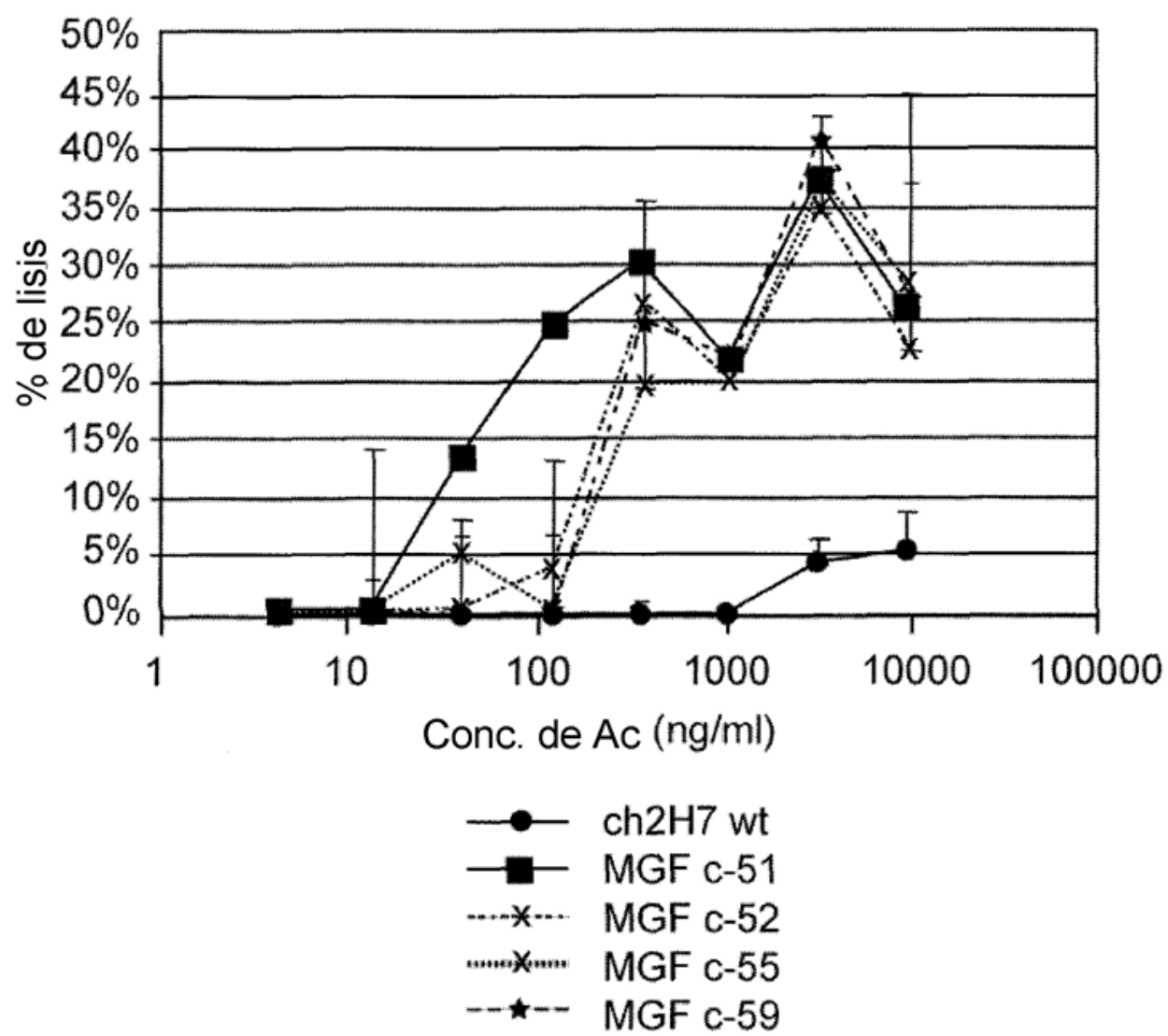


FIG. 17

FIG. 18



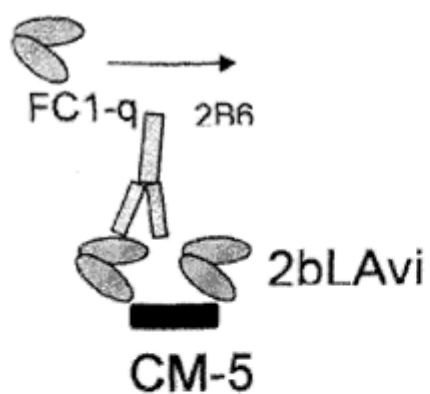


FIG. 19A

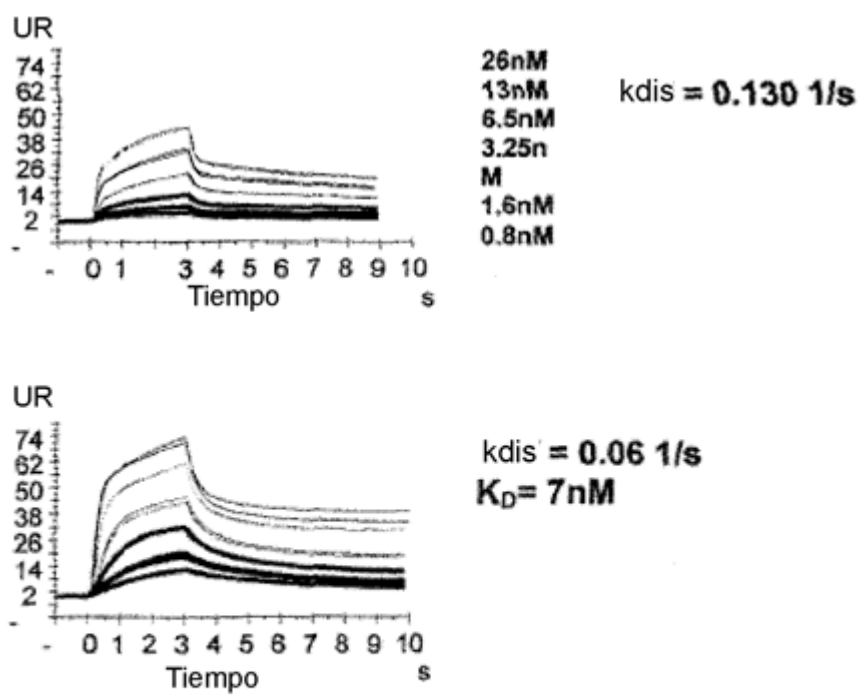
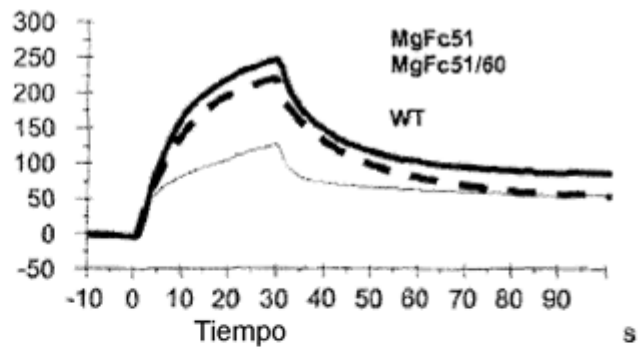


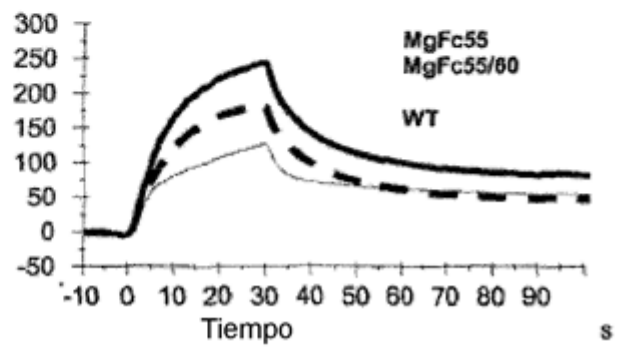
FIG. 19B

FIG. 20A



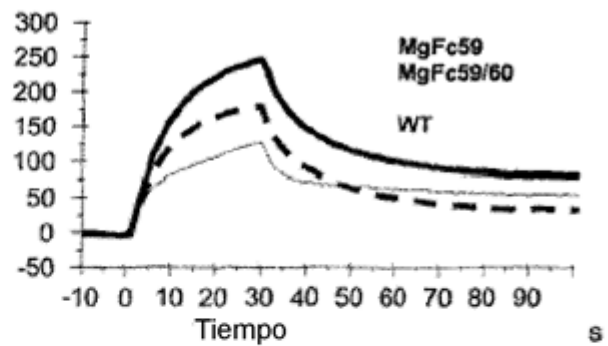
UR

FIG. 20B



UR

FIG. 20C



UR

FIG. 20D

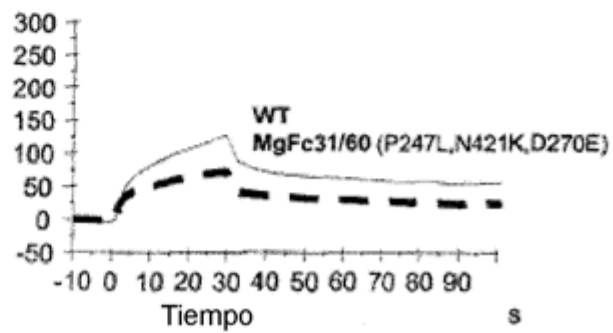


FIG. 21A

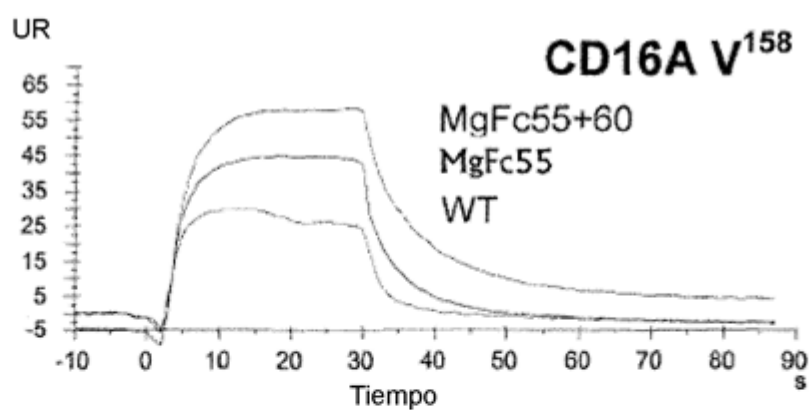


FIG. 21B

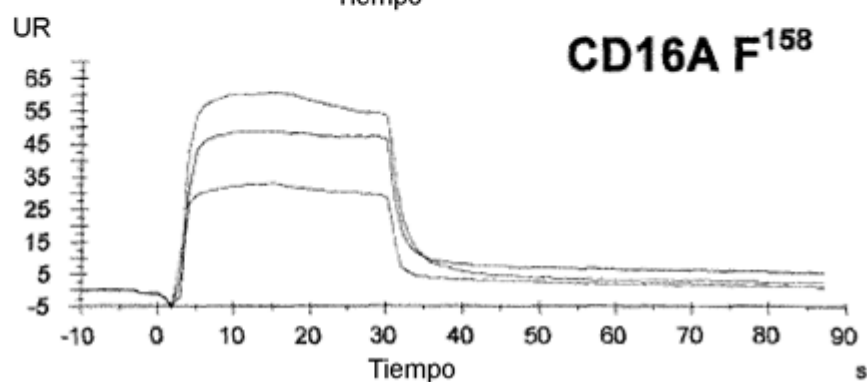


FIG. 21C

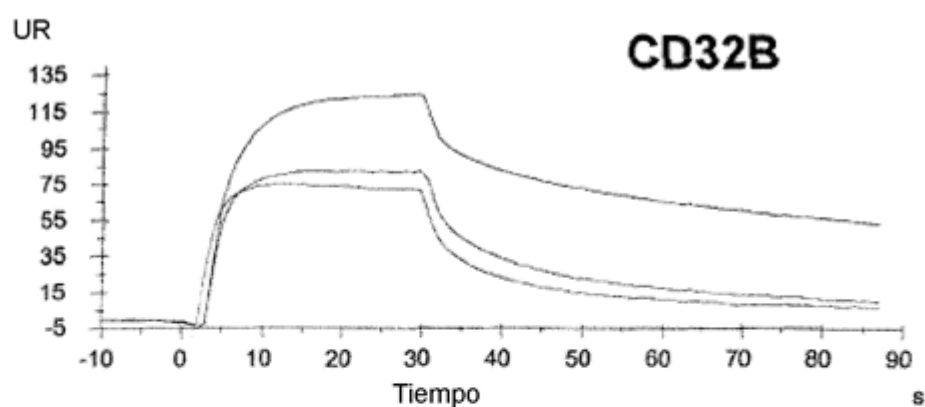


FIG. 21D

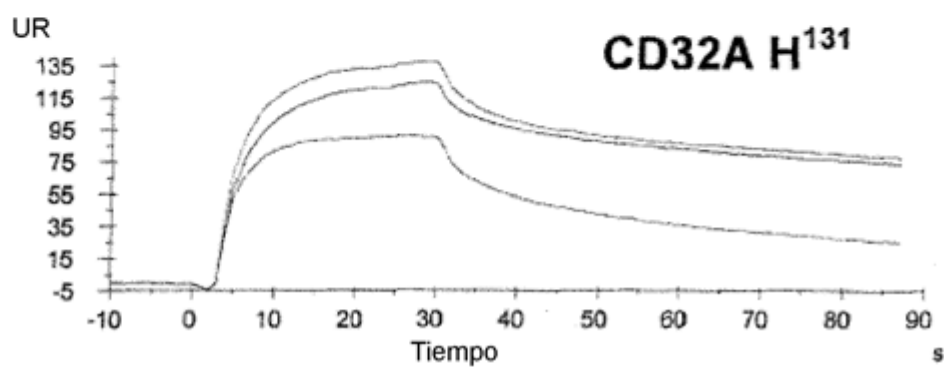


FIG. 22A

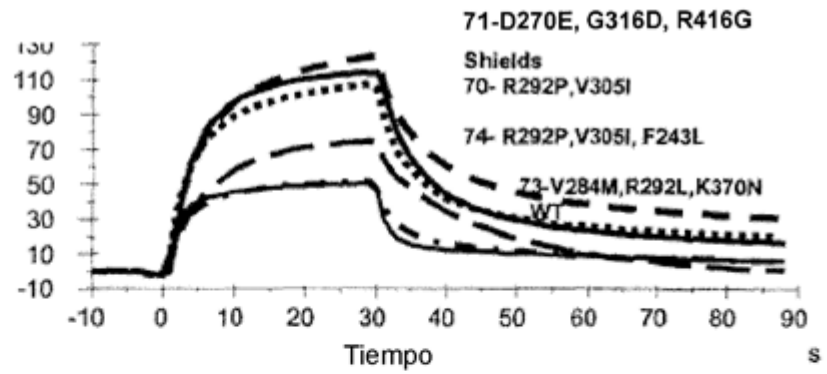


FIG. 22B

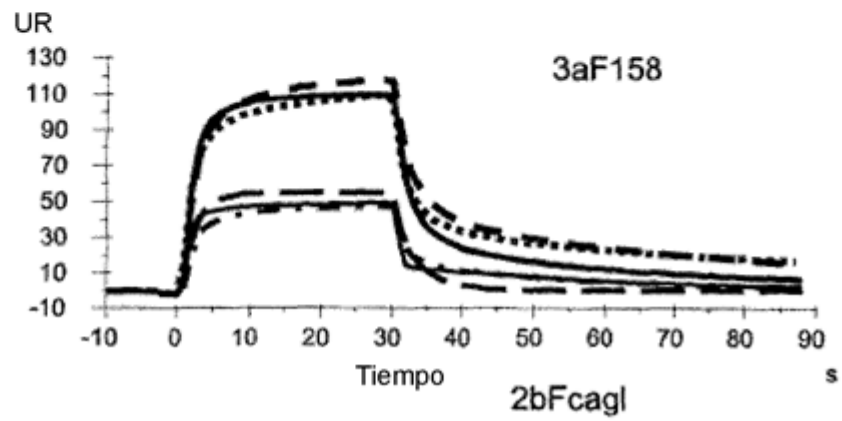


FIG. 22C

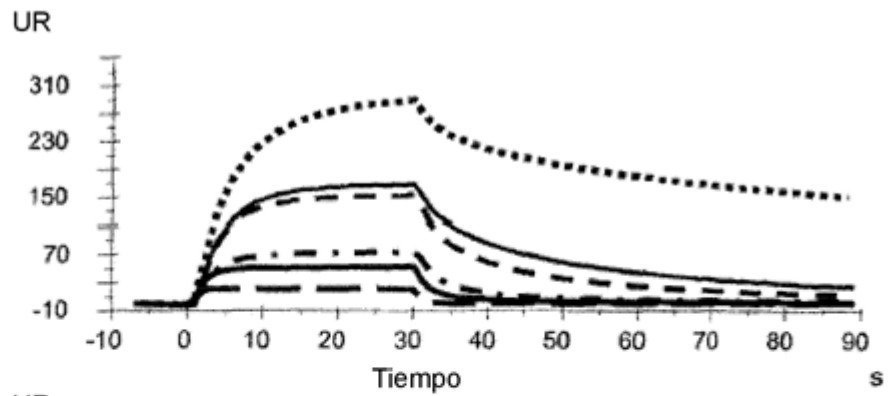
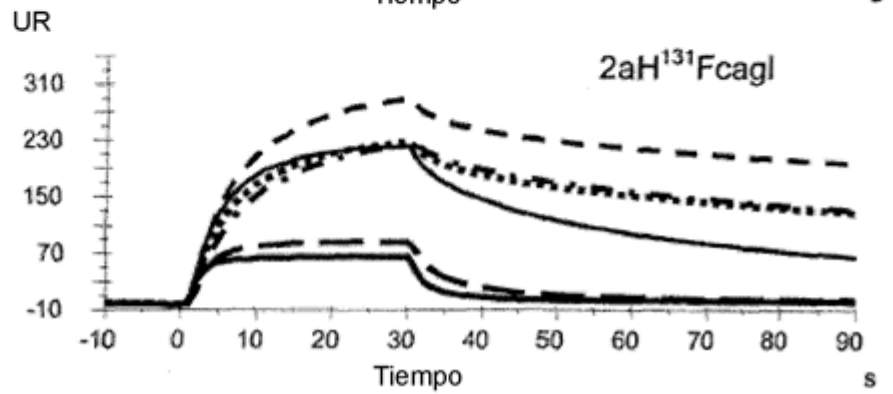


FIG. 22D



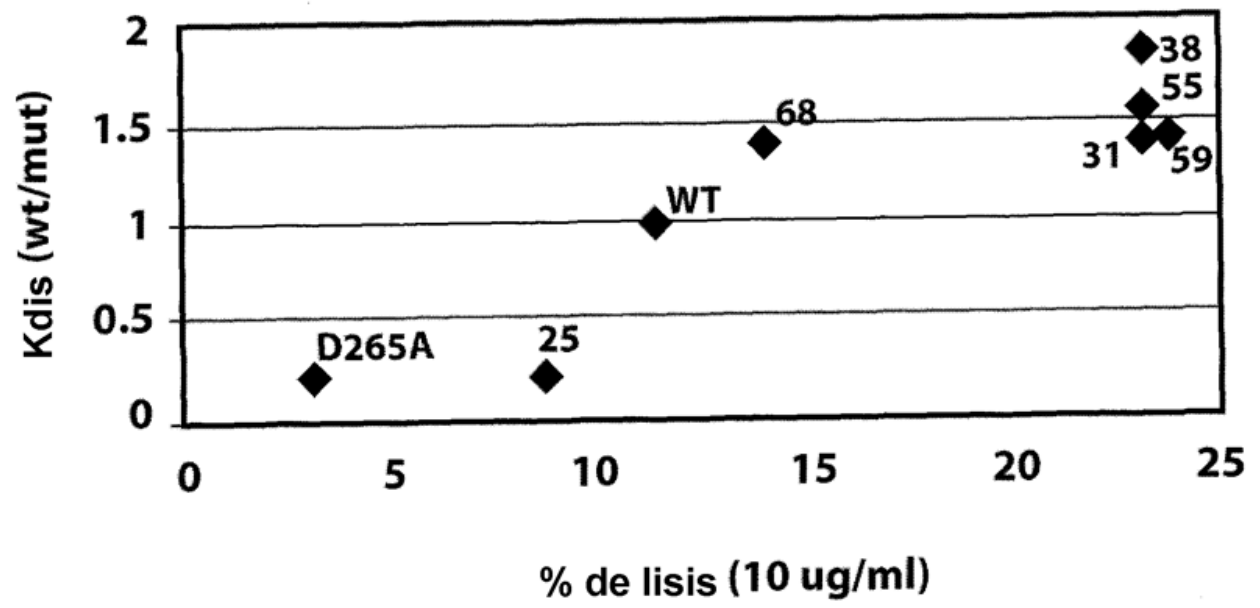


FIG. 23

ADCC (In-111)_ch4D5 FcVar(HT29) (31.03.2005)

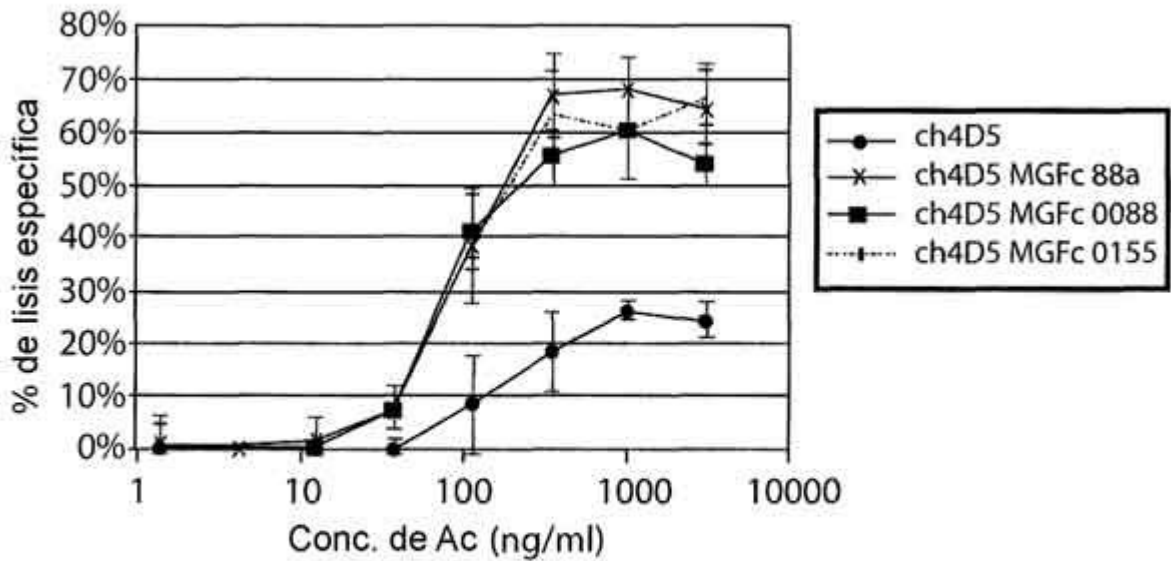


FIG. 24A

ADCC (In-111)_ch4D5 FcVar(HT29)(05.04.2005)

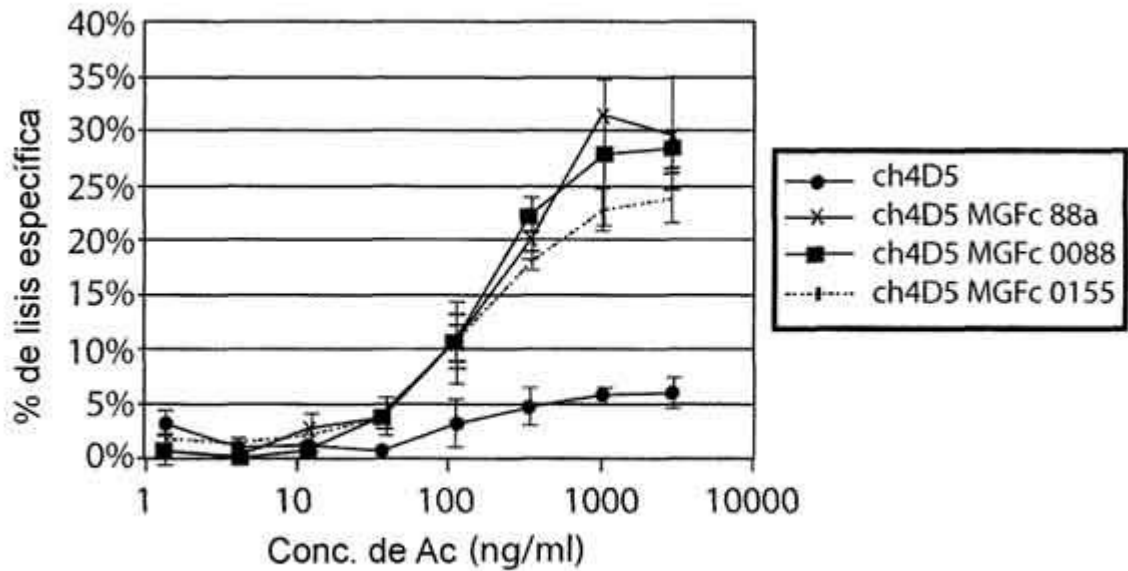


FIG. 24B

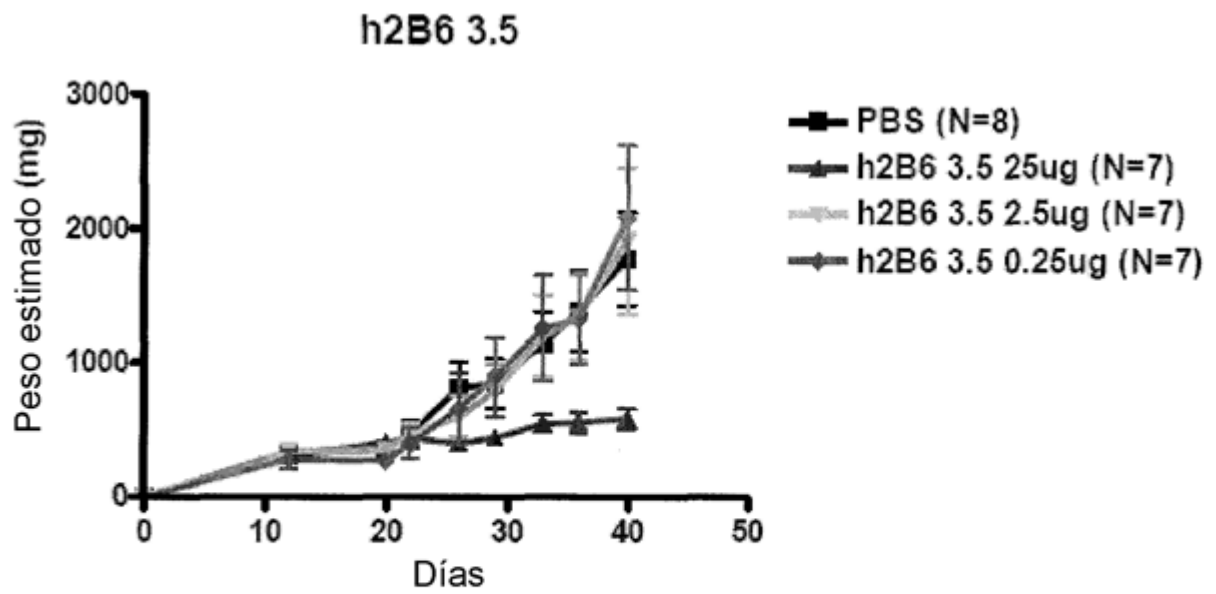


FIG. 25A

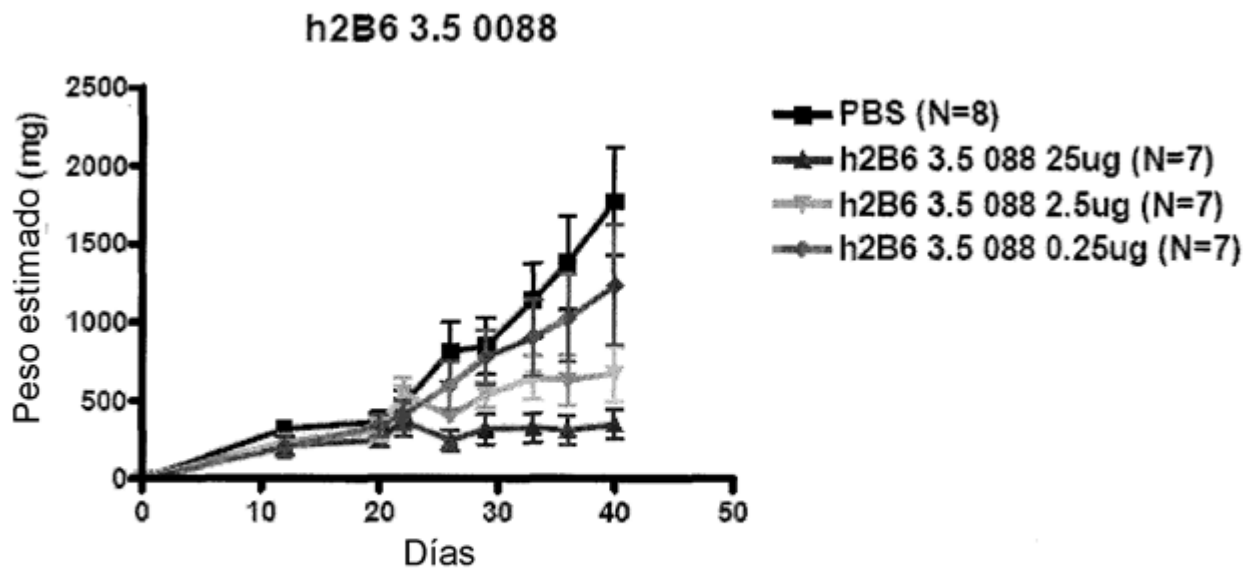


FIG. 25B

Supervivencia libre de tumor de h2B6 3.5: proporciones de supervivencia

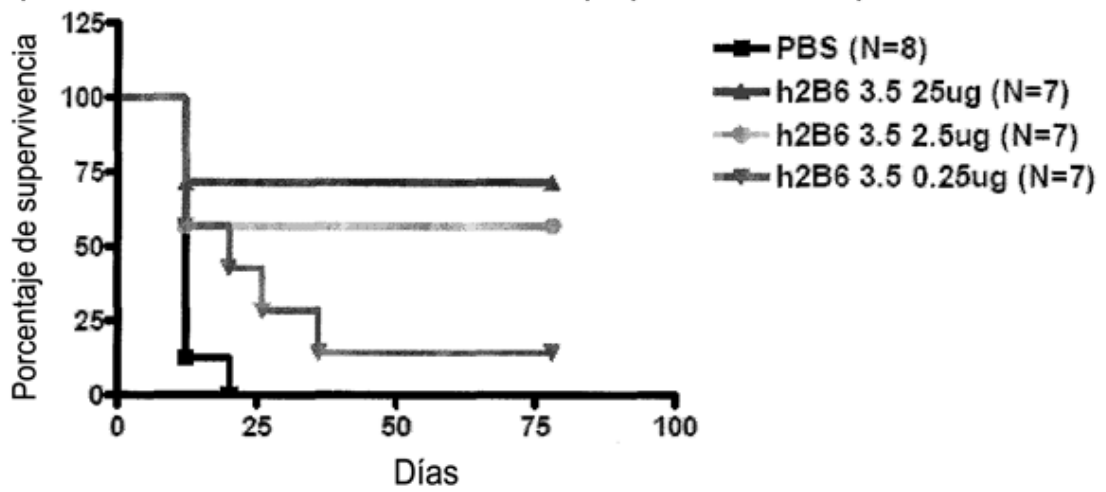


FIG. 26A

Supervivencia libre de tumor de h2B6 3.5 0088: proporciones de supervivencia

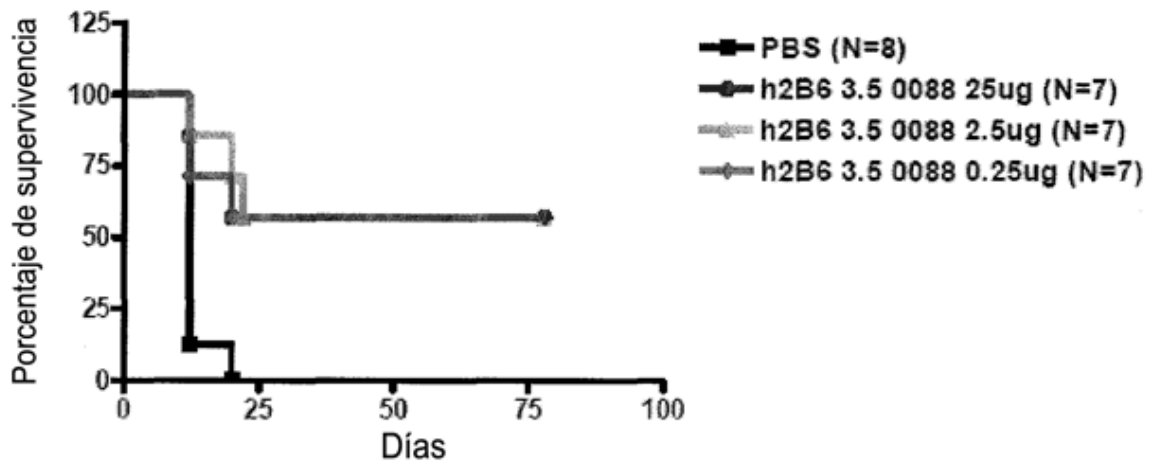


FIG. 26B

060609 - Raji - mCD16^{-/-} hCD16A+ RAG1^{-/-} B6
 PBS, Rituxan 250, 25, 2.5ug, MGA321 250, 25, 2.5ug

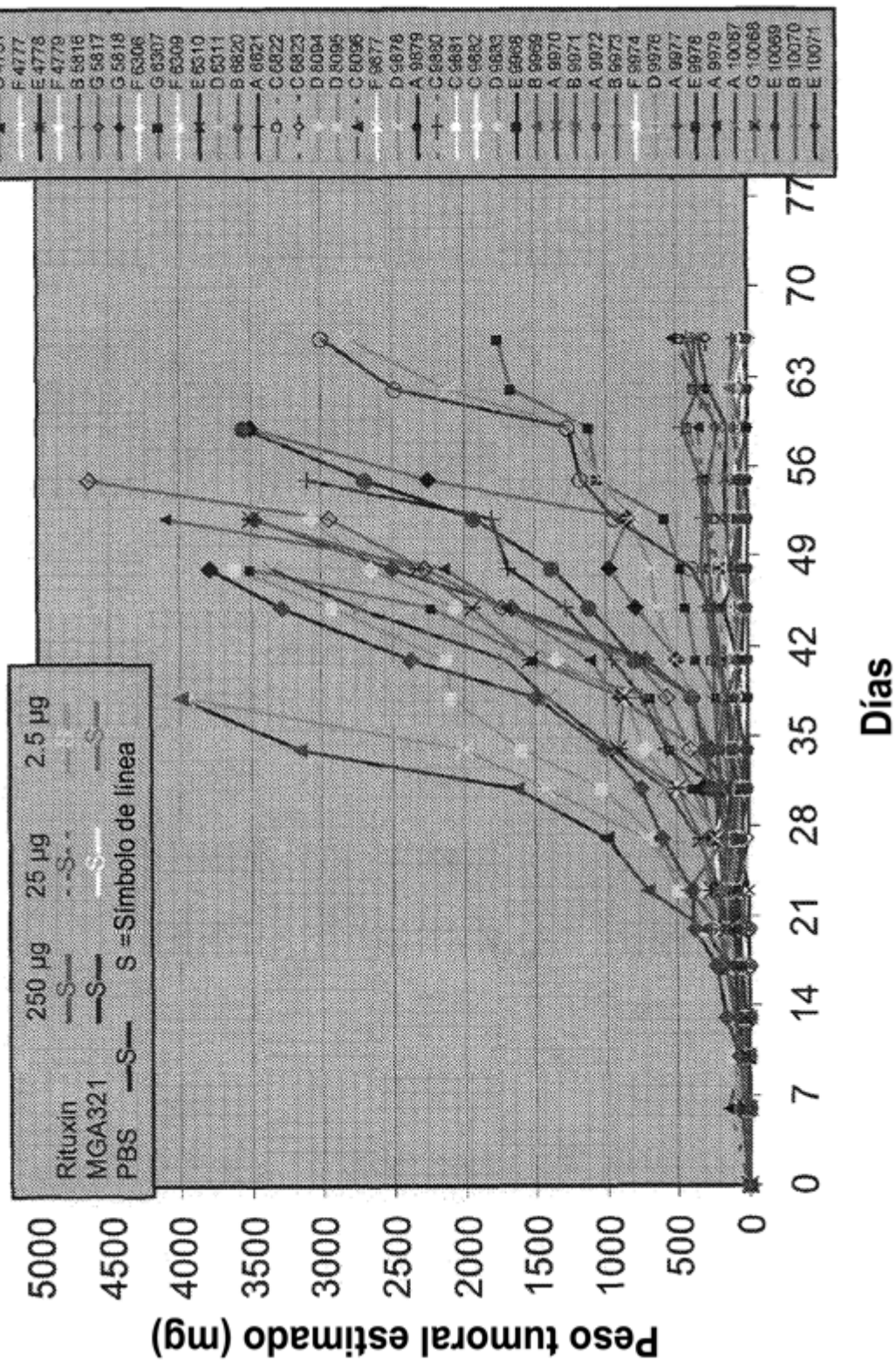


FIG. 27

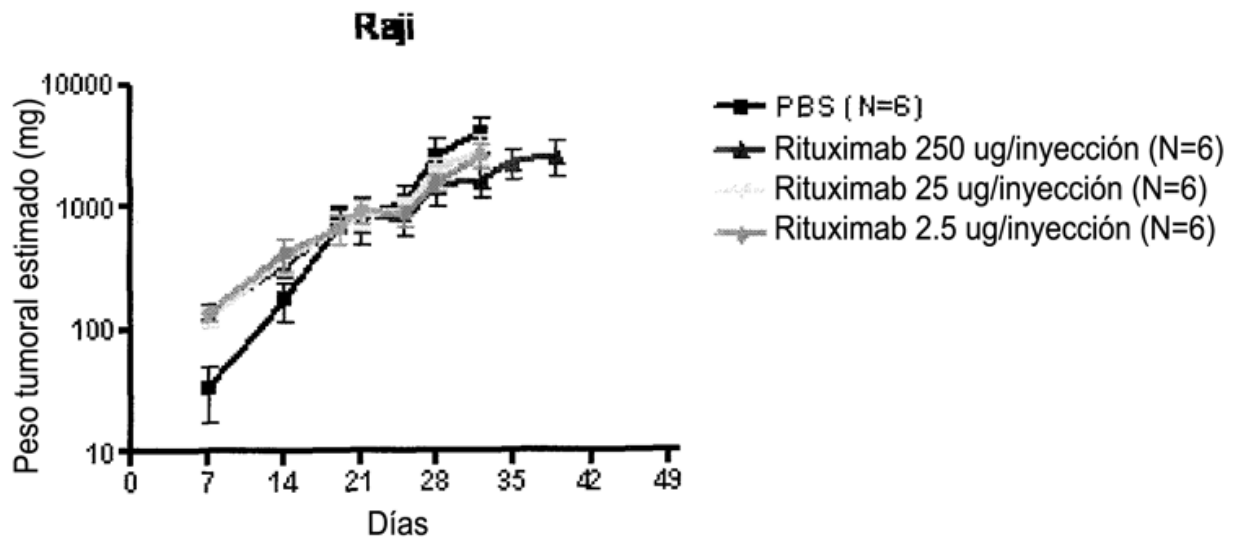


FIG. 28 A

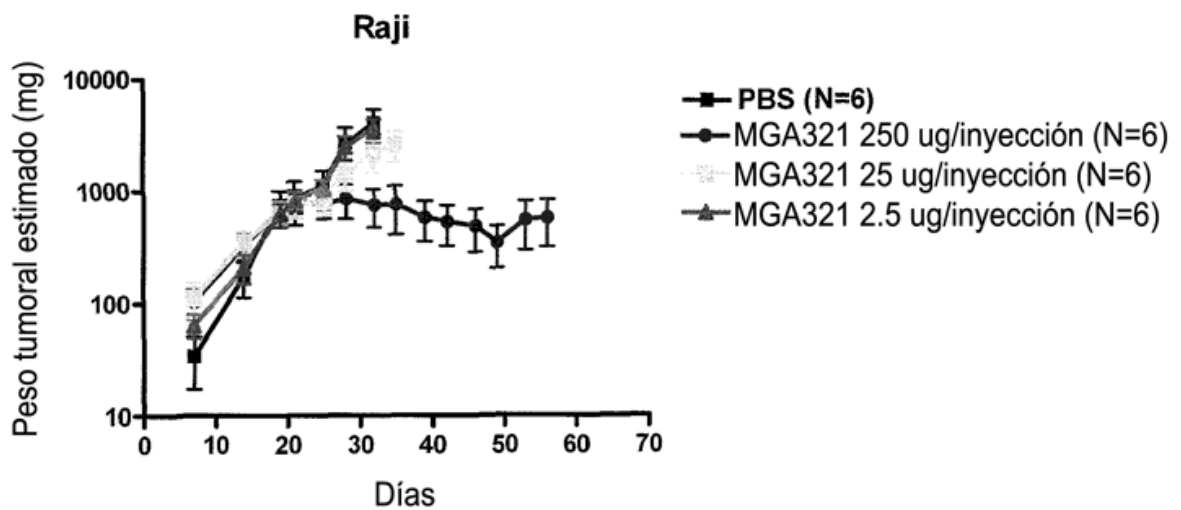


FIG. 28 B

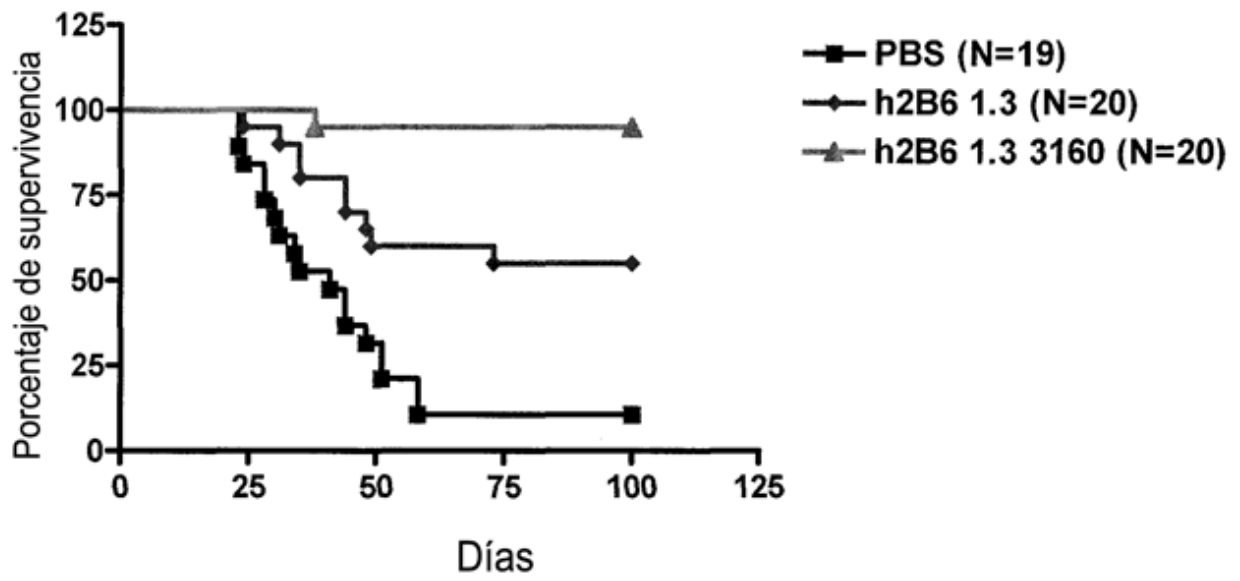


FIG. 29

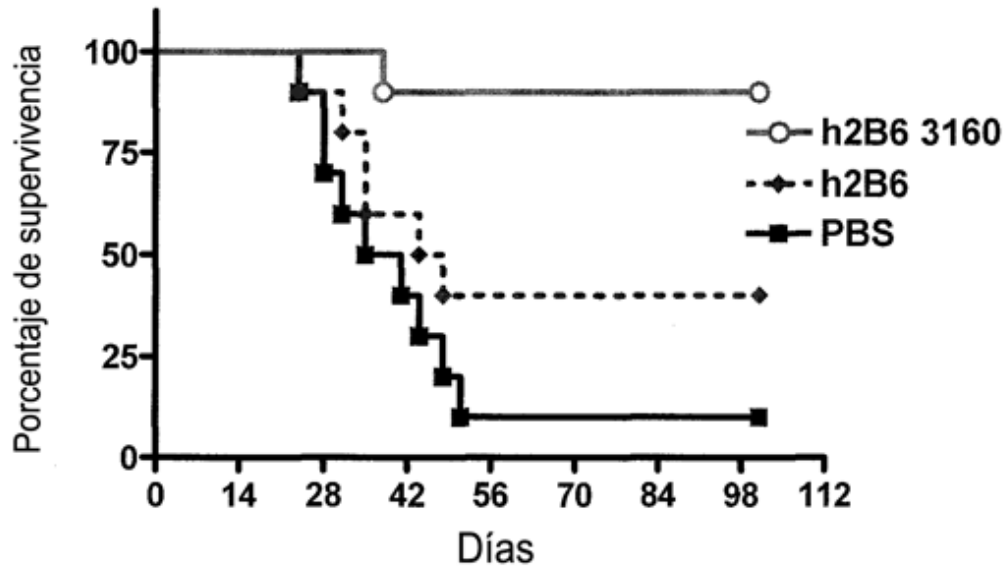


FIG. 30

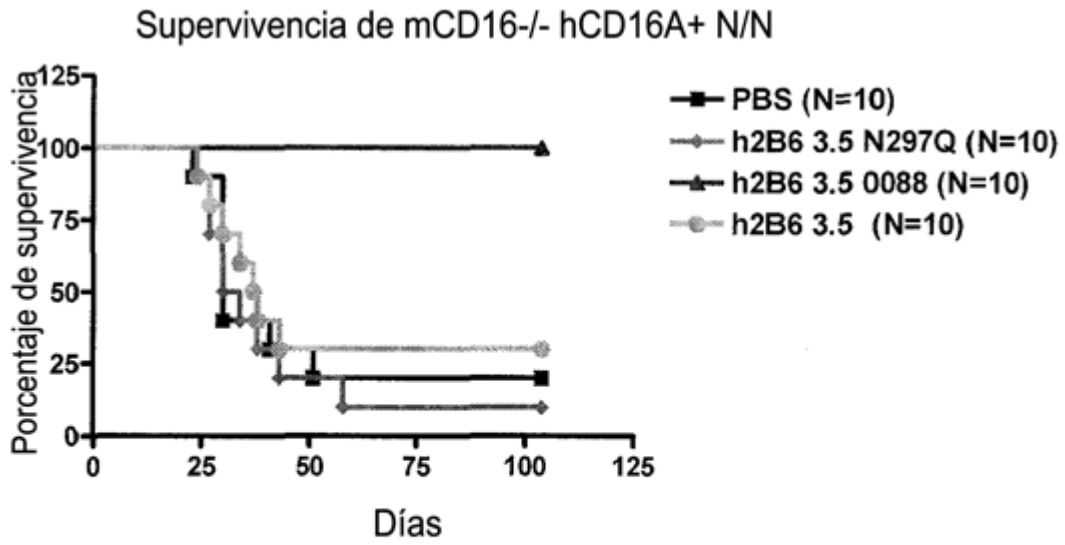


FIG. 31A

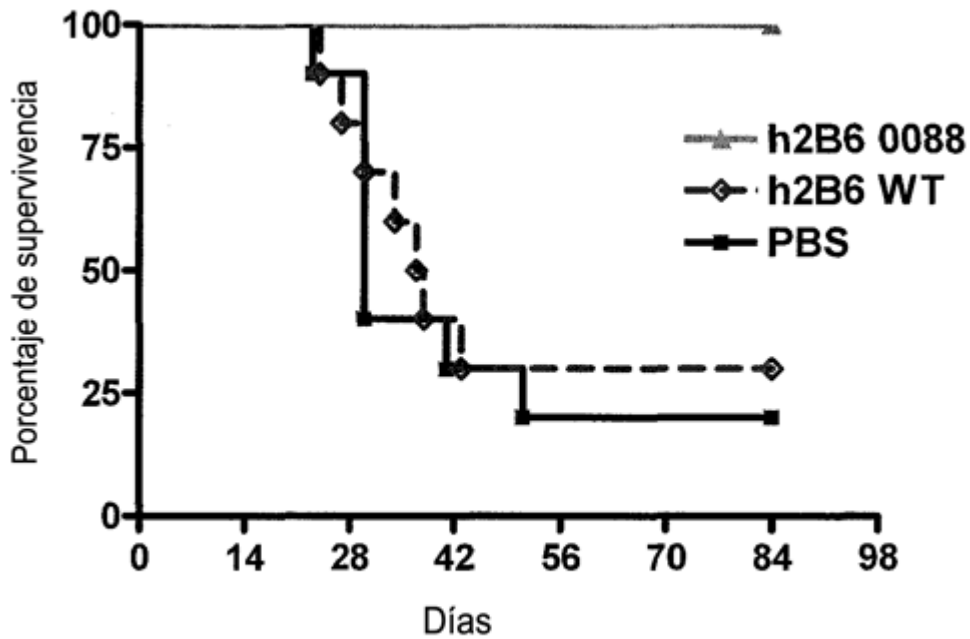


FIG. 31B

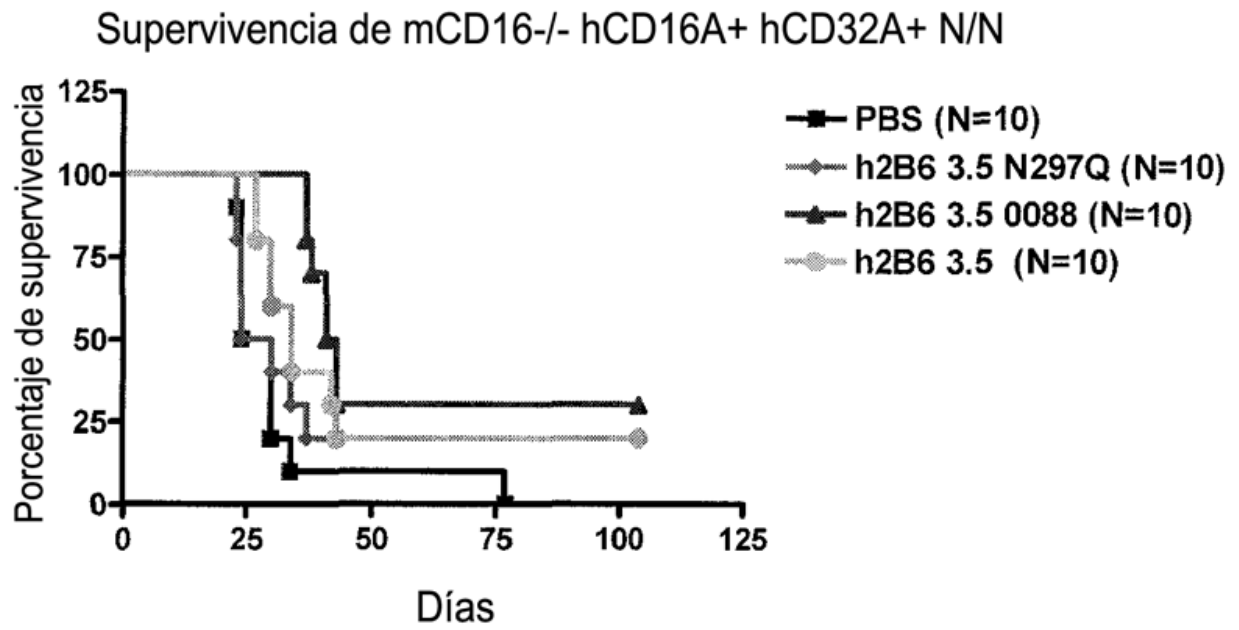


FIG. 32

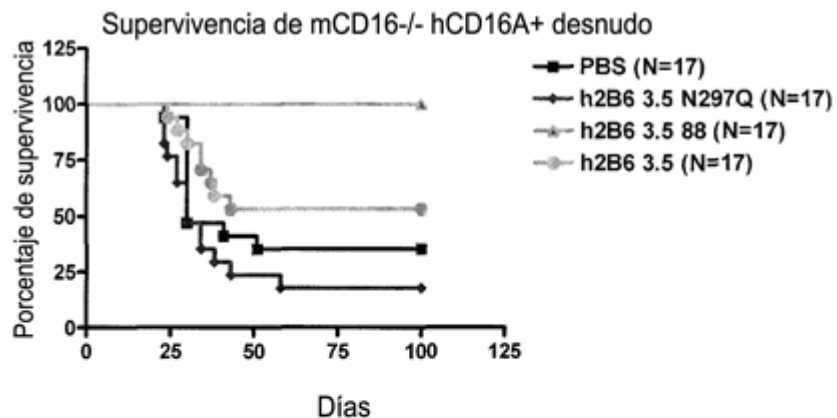


FIG. 33A

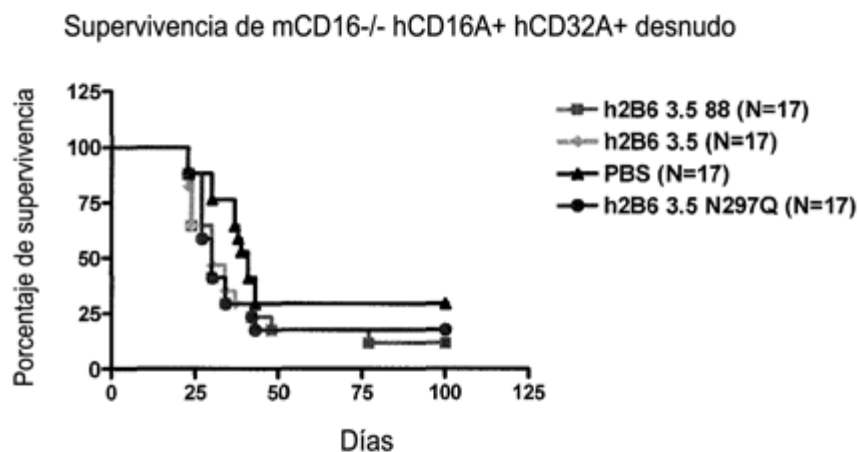


FIG. 33B

Supervivencia de mCD16^{-/-} hCD32A⁺ desnudo:
proporciones de supervivencia

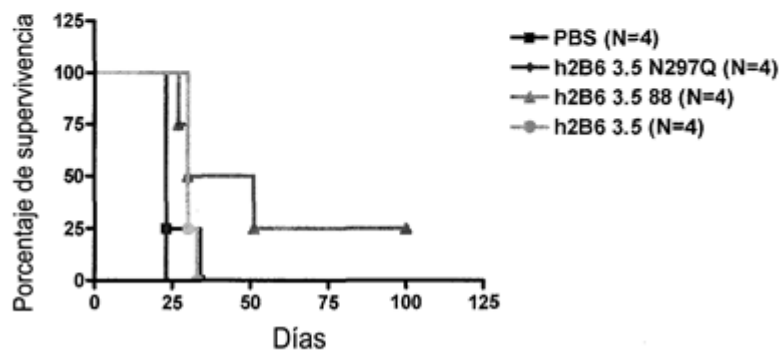


FIG. 33C

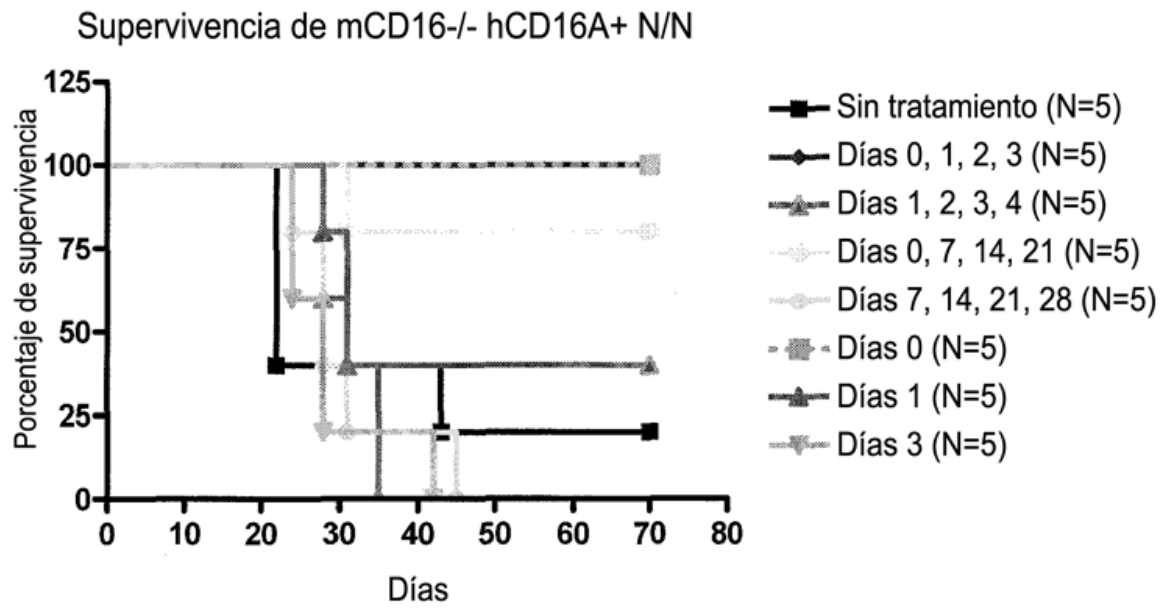


FIG. 34

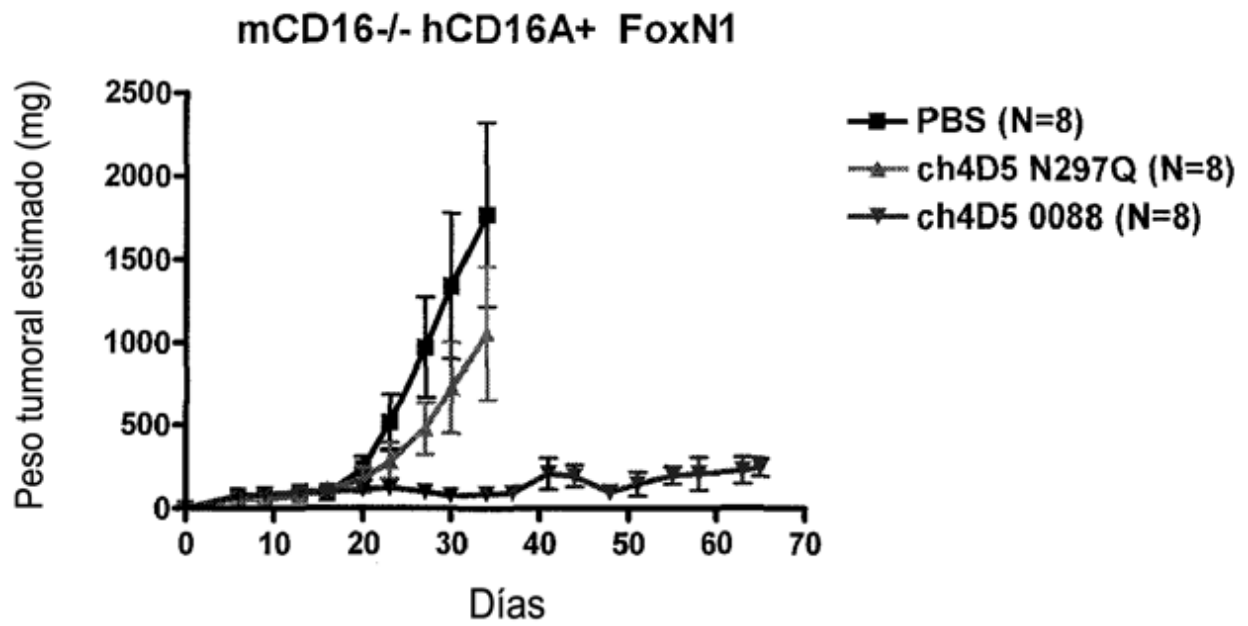


FIG. 35A

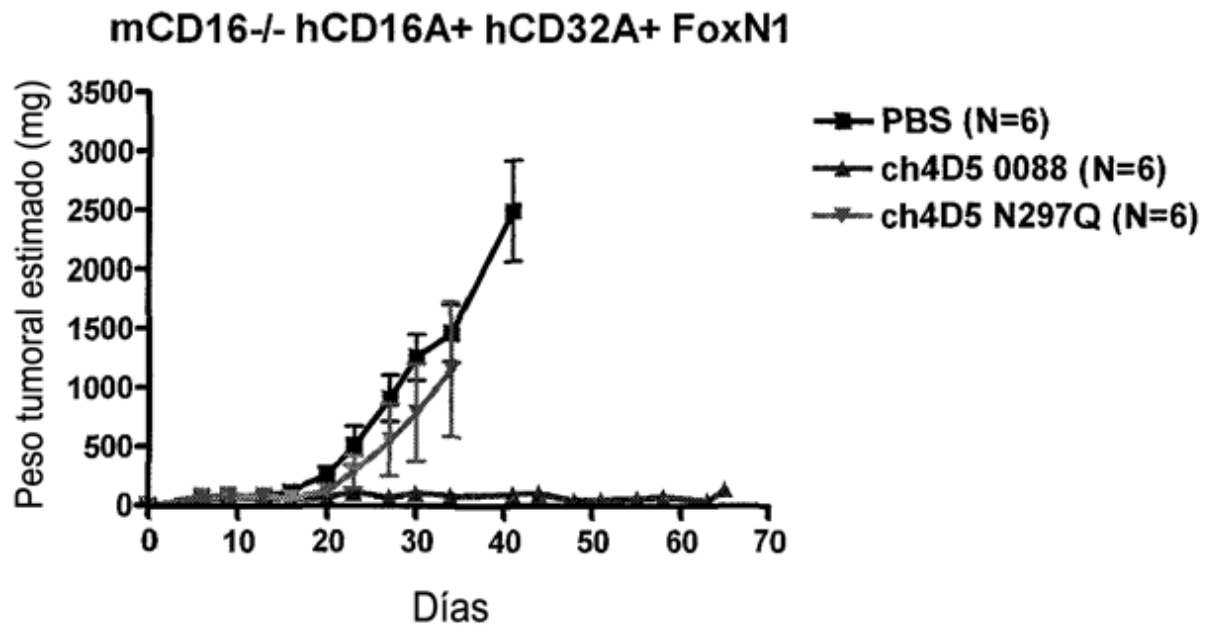


FIG. 35B

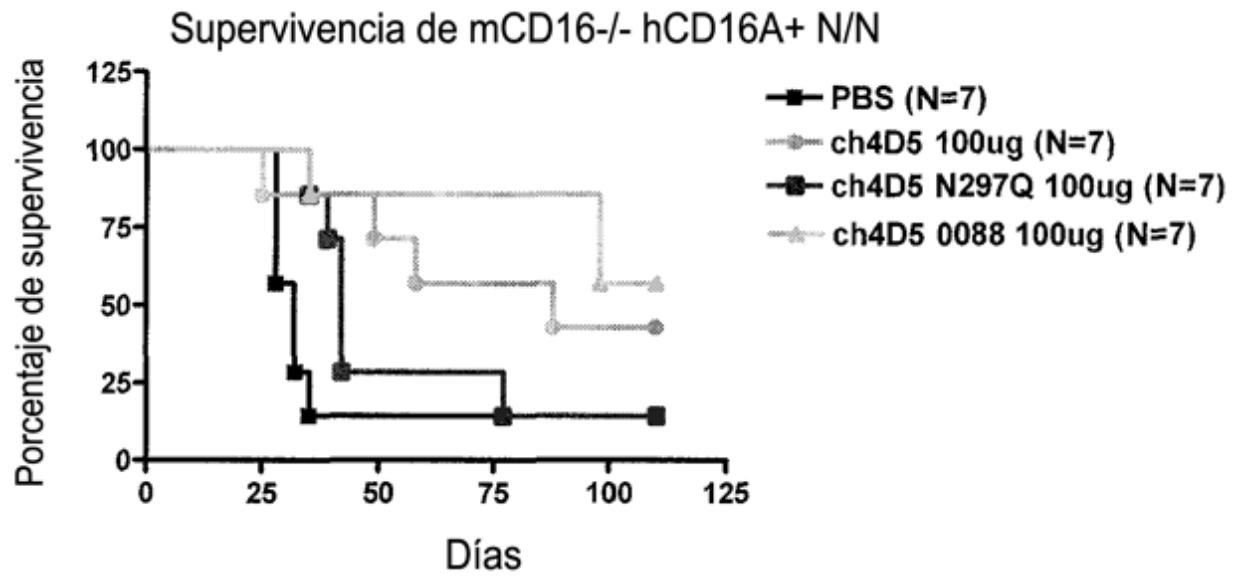


FIG. 36A

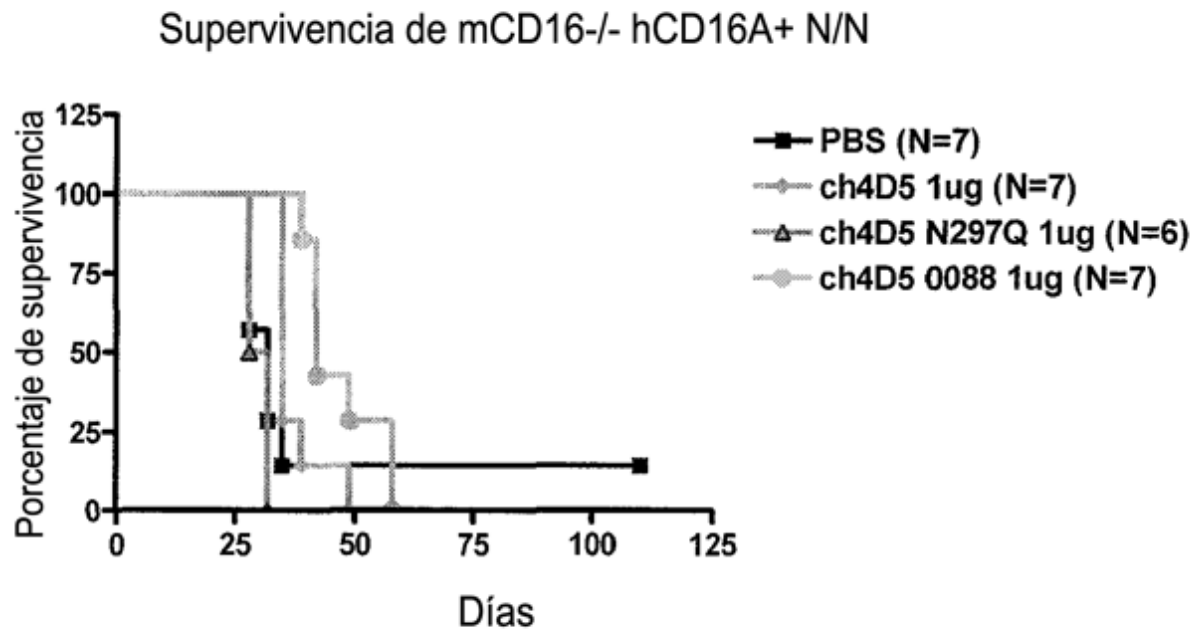


FIG. 36B

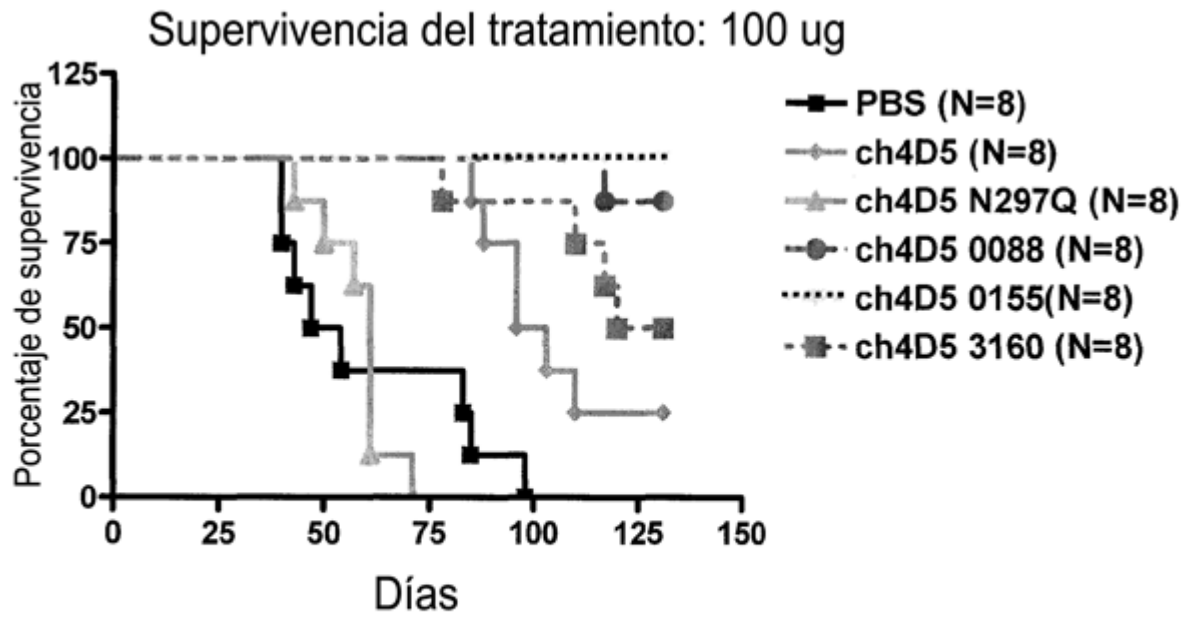


FIG. 37A

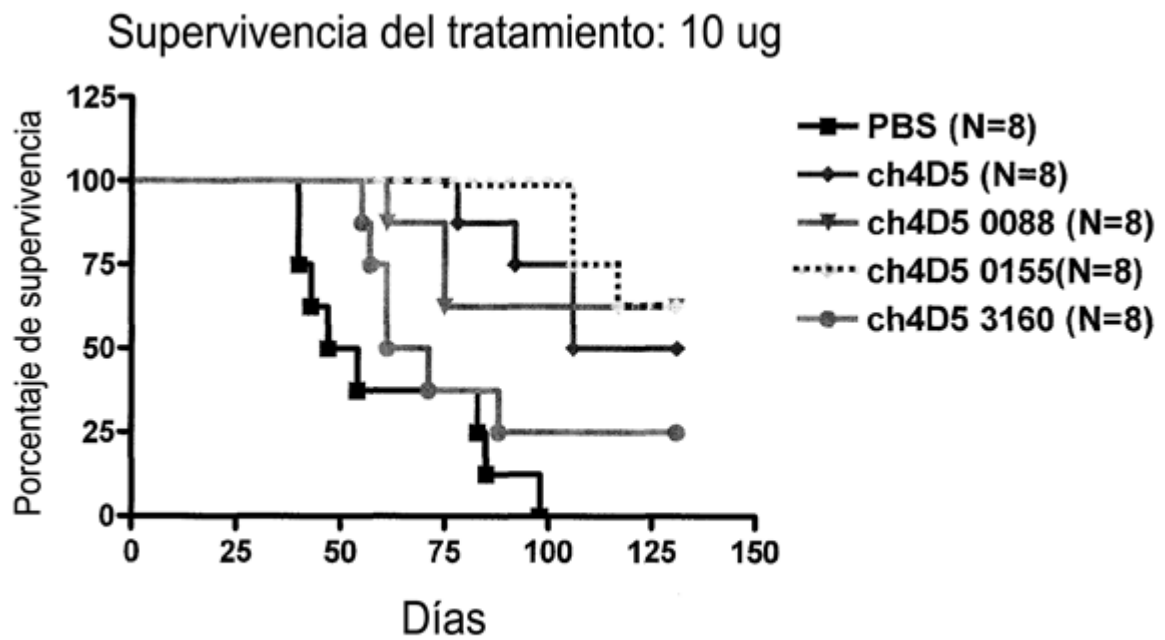


FIG. 37B

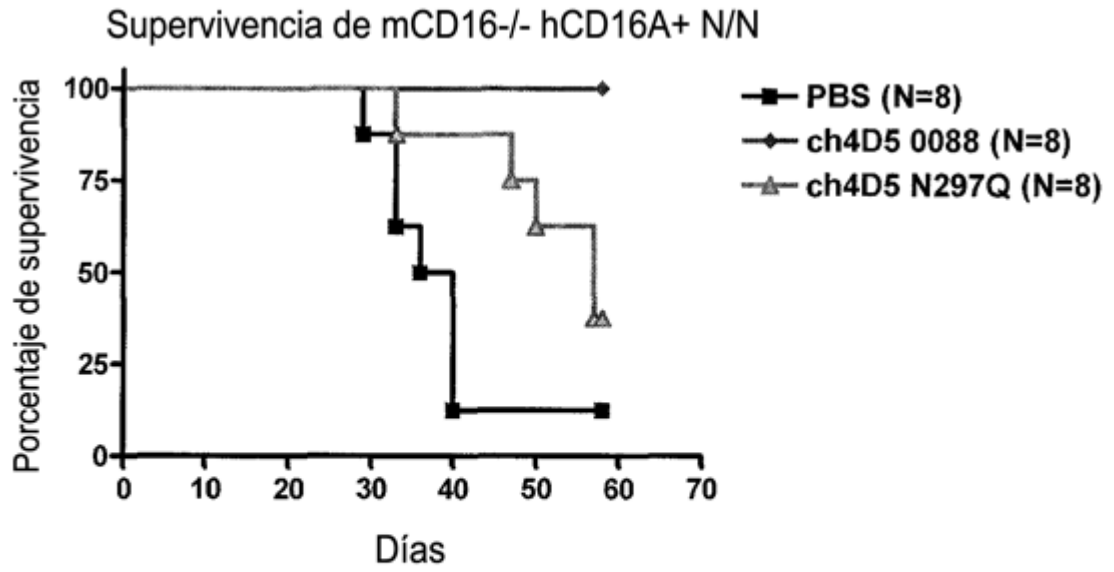


FIG. 38A

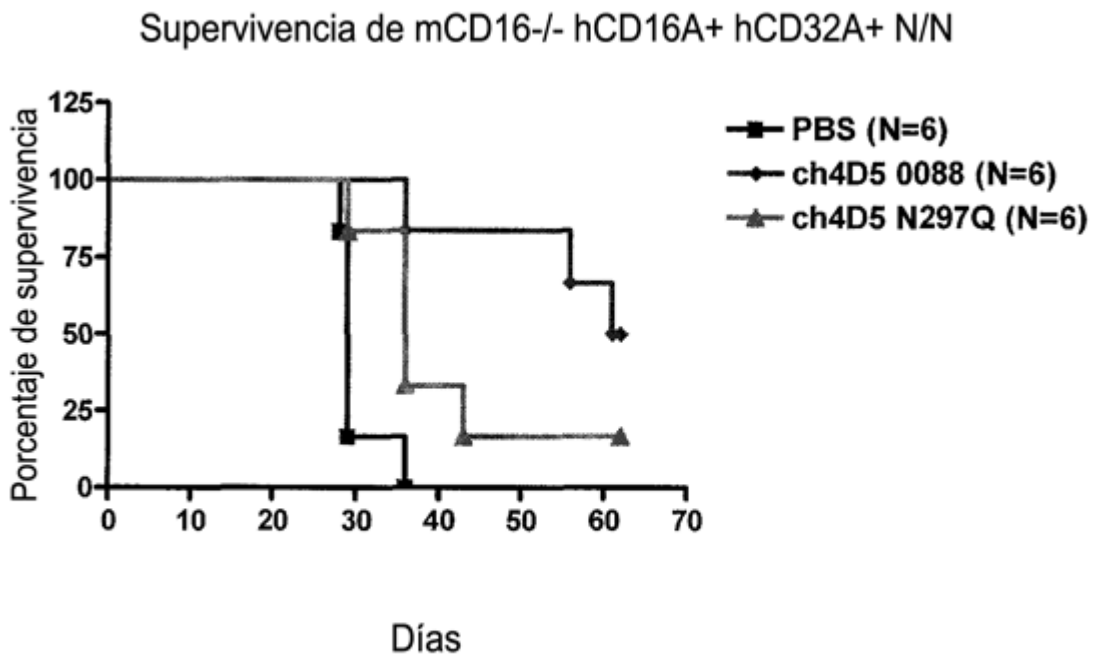
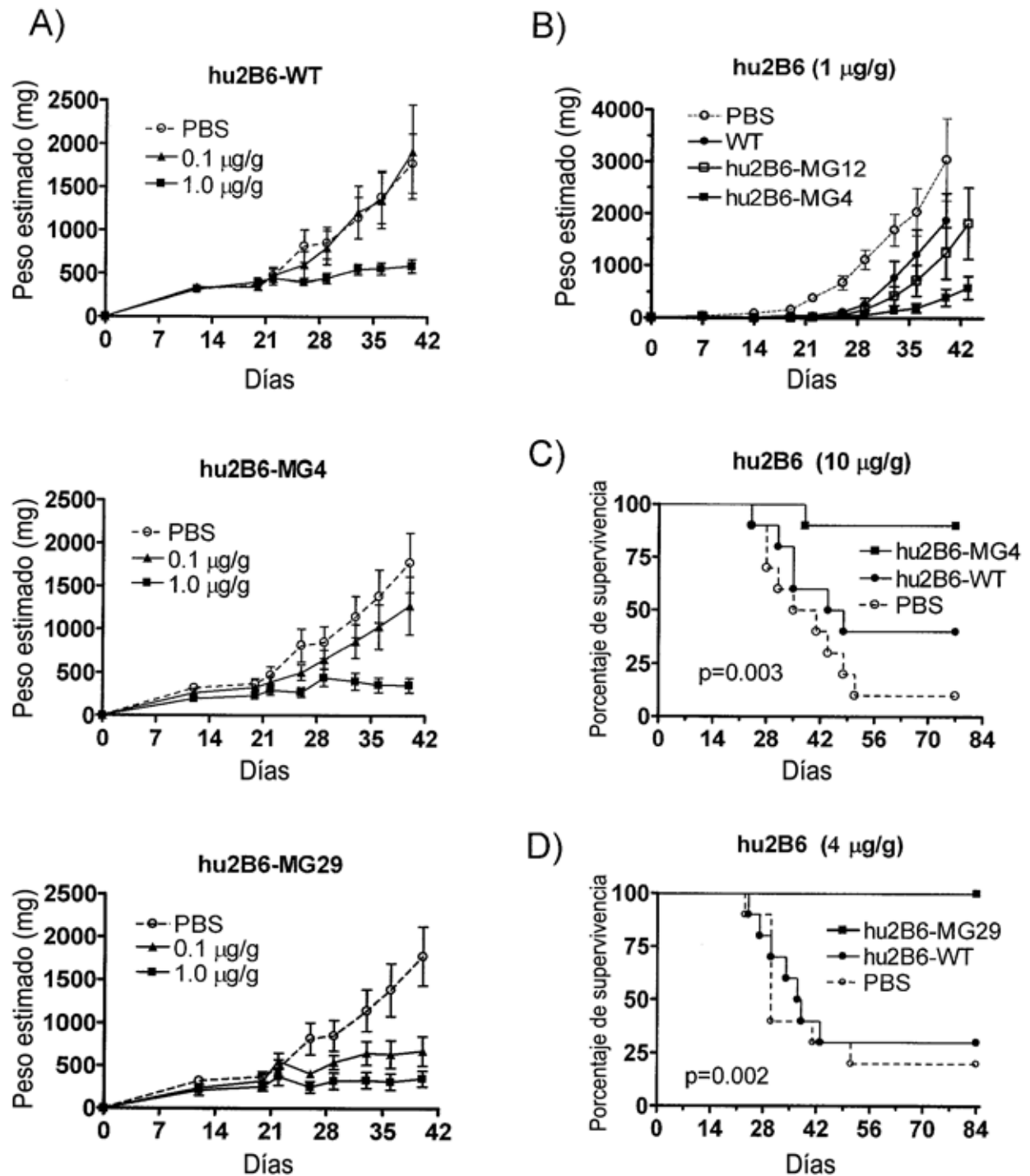
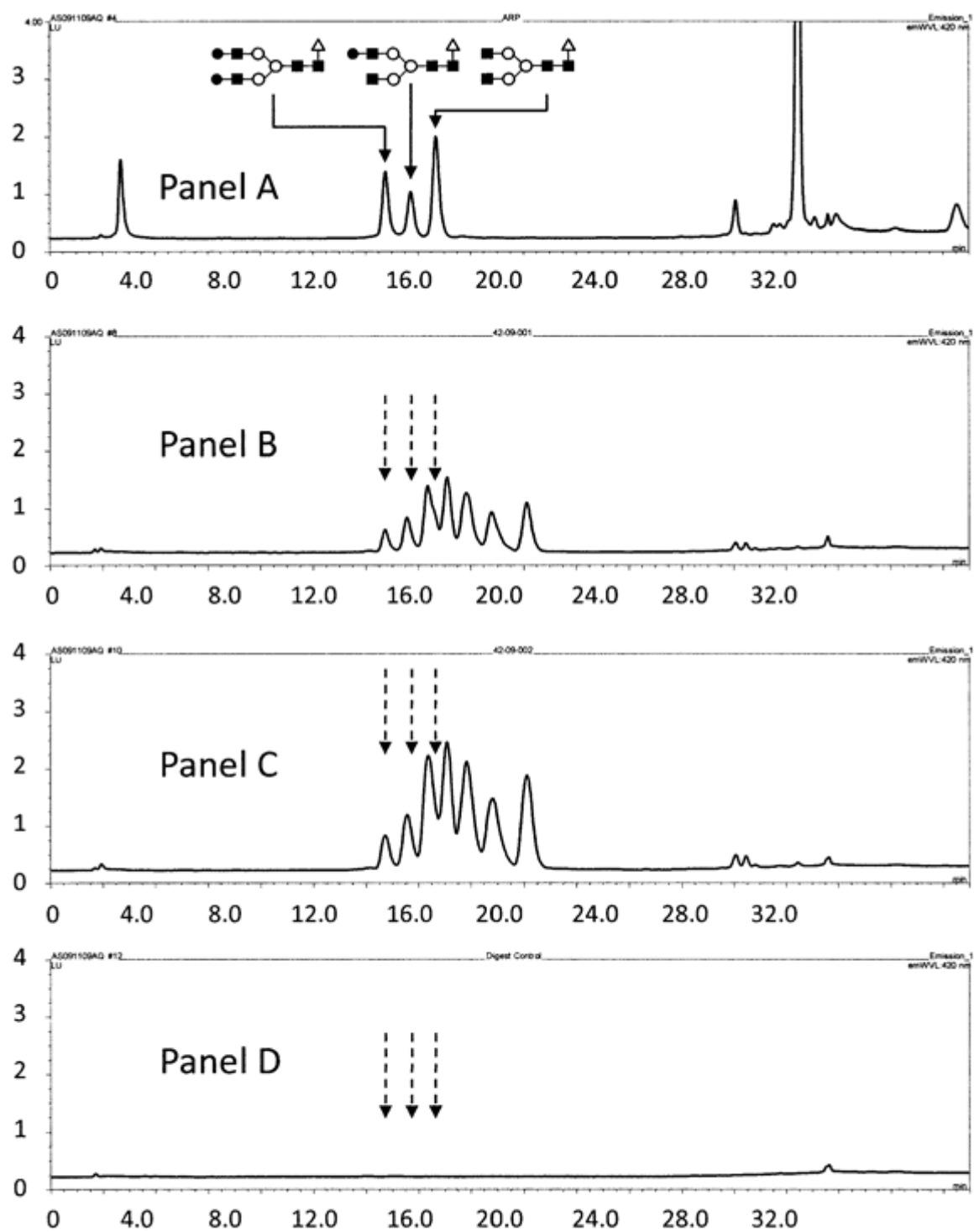


FIG. 38B

Figura 39

**Figura 40**

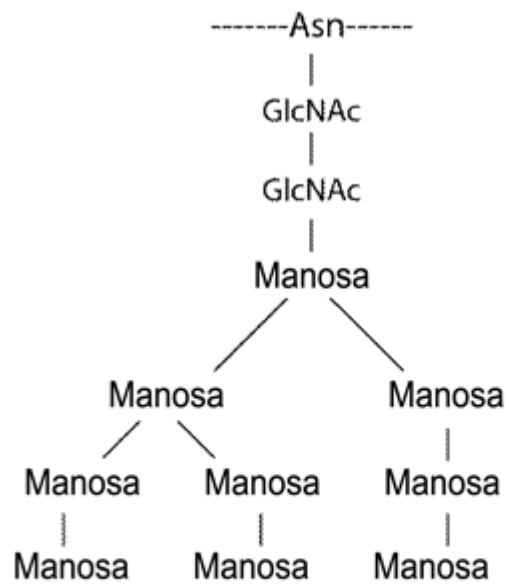


Figura 41

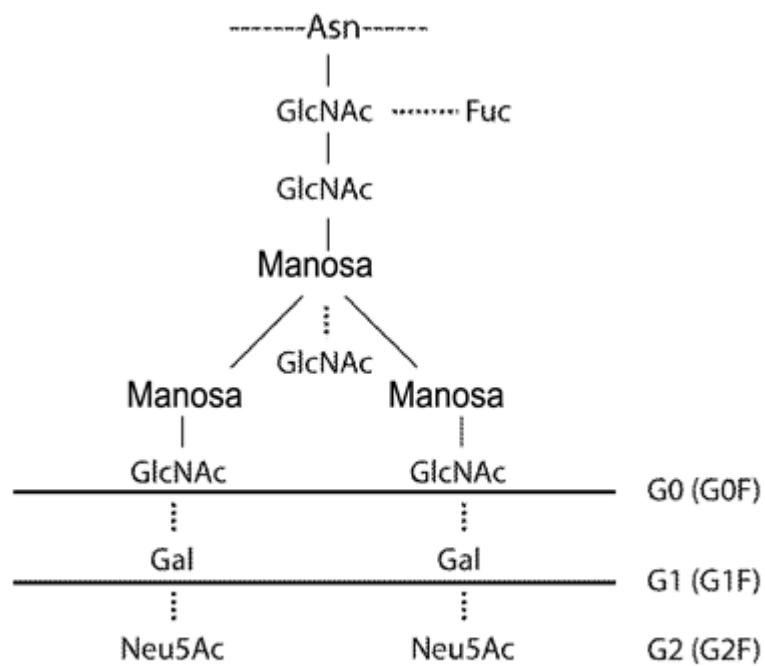


Figura 42

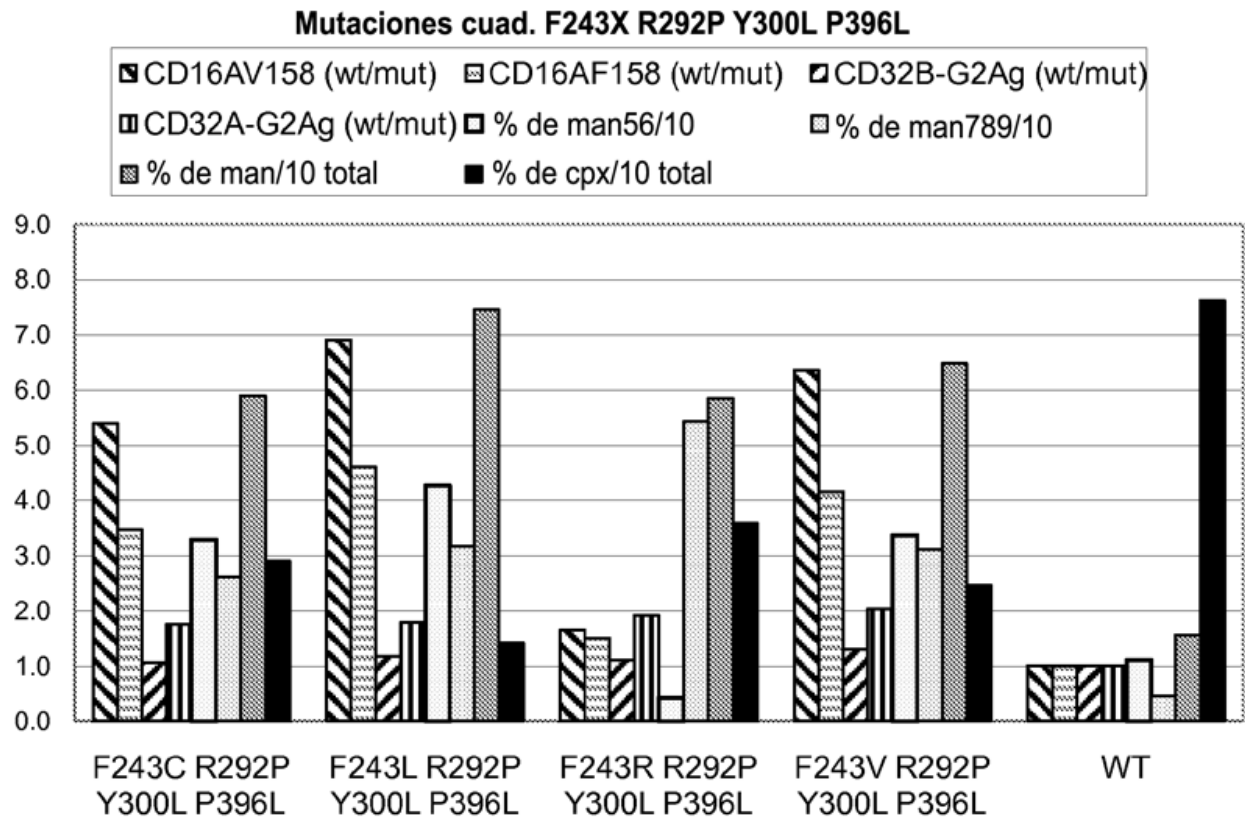


Figura 43

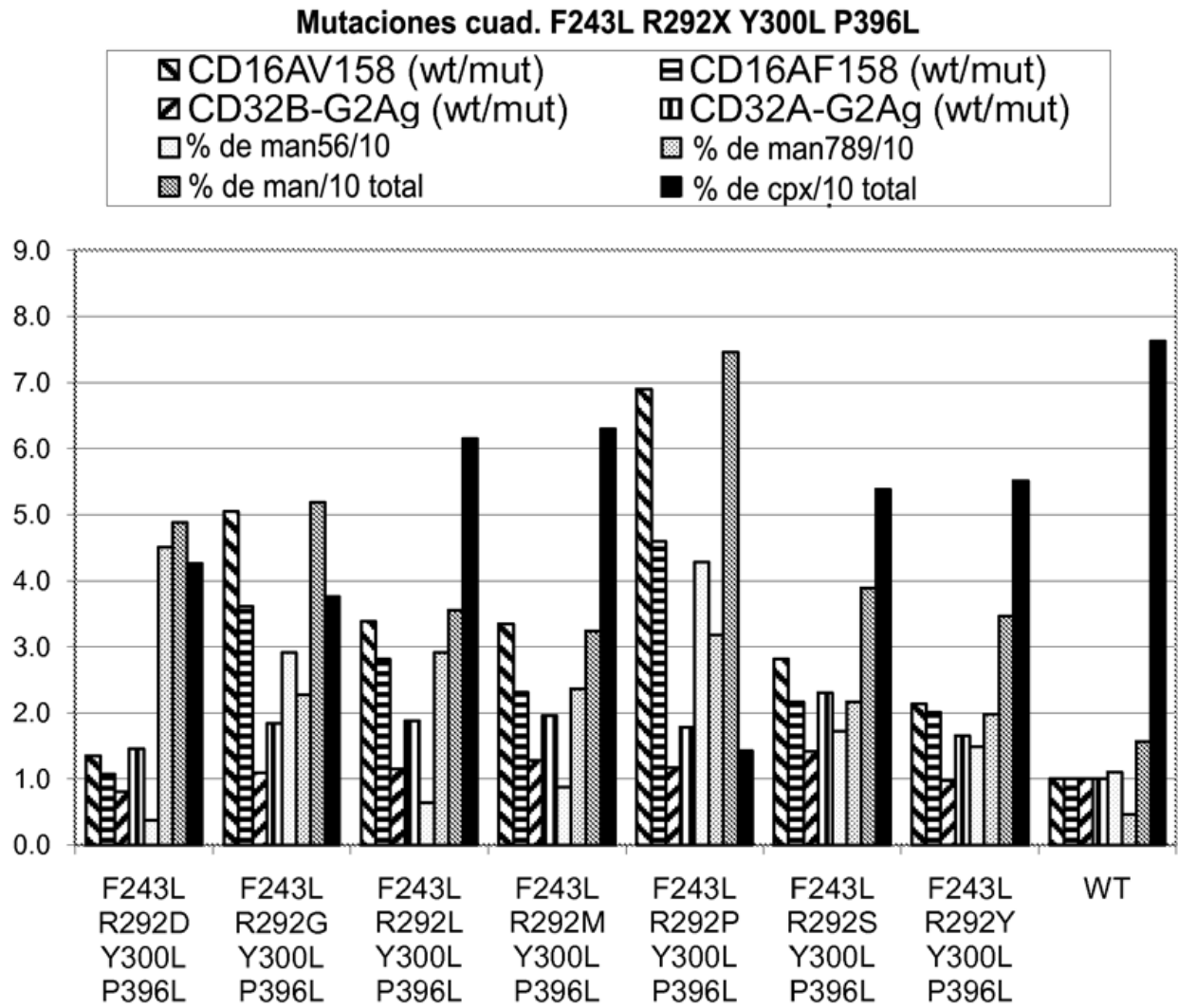


Figura 44

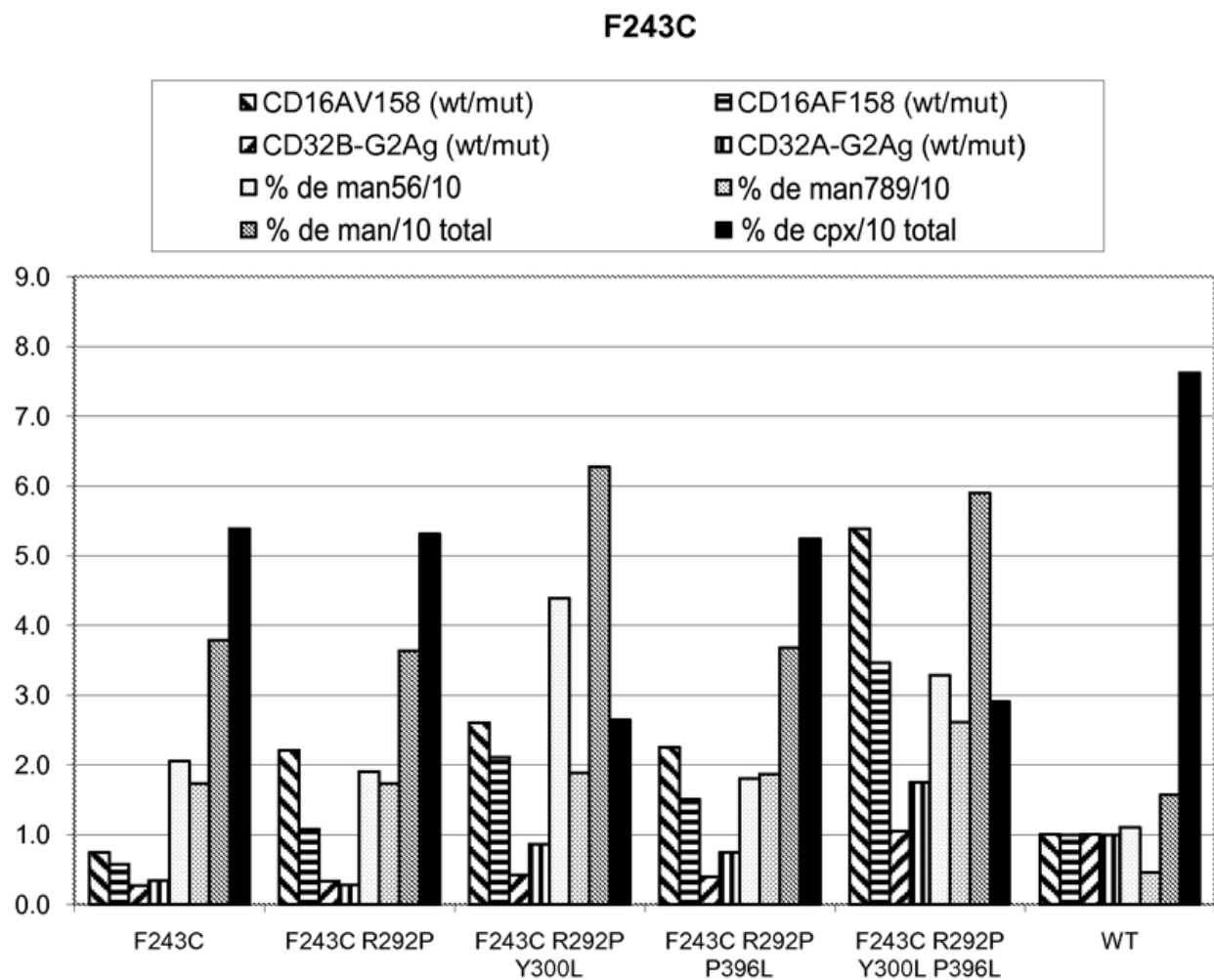


Figura 45

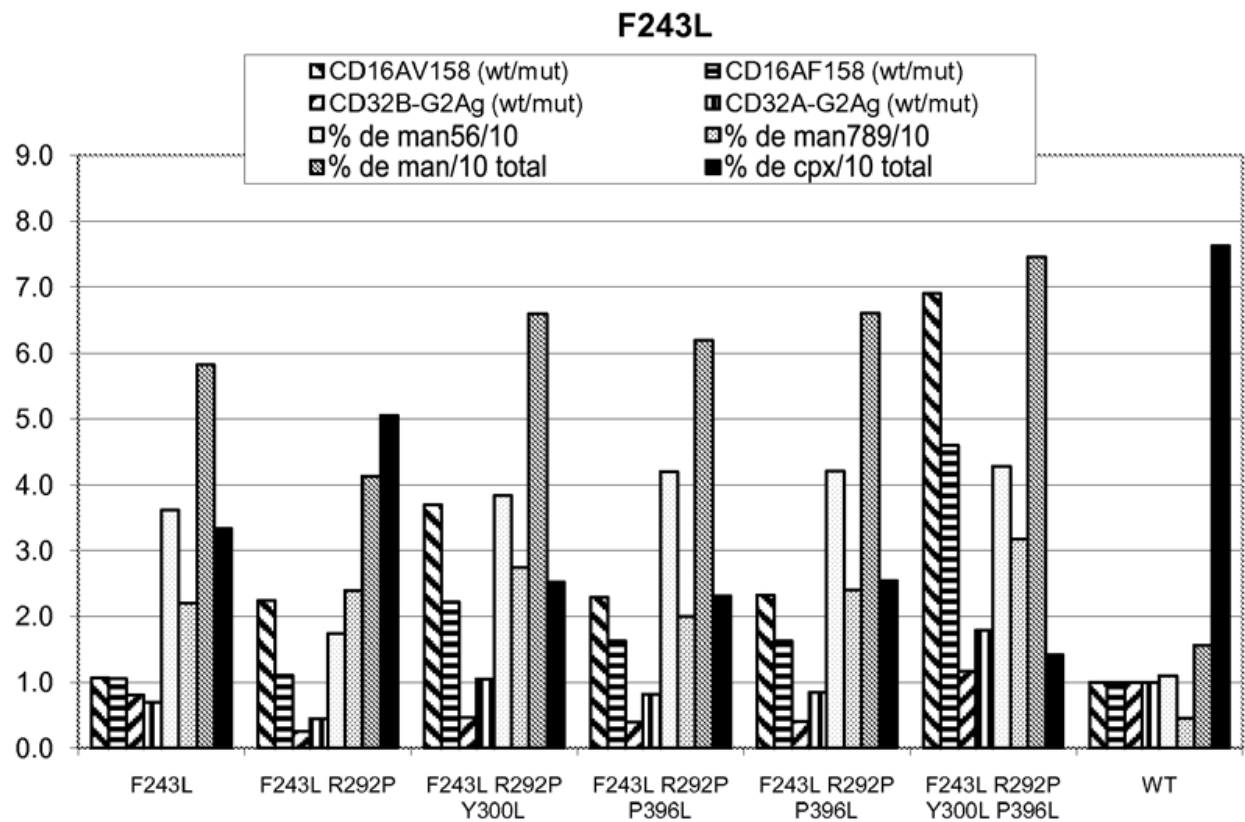


Figura 46

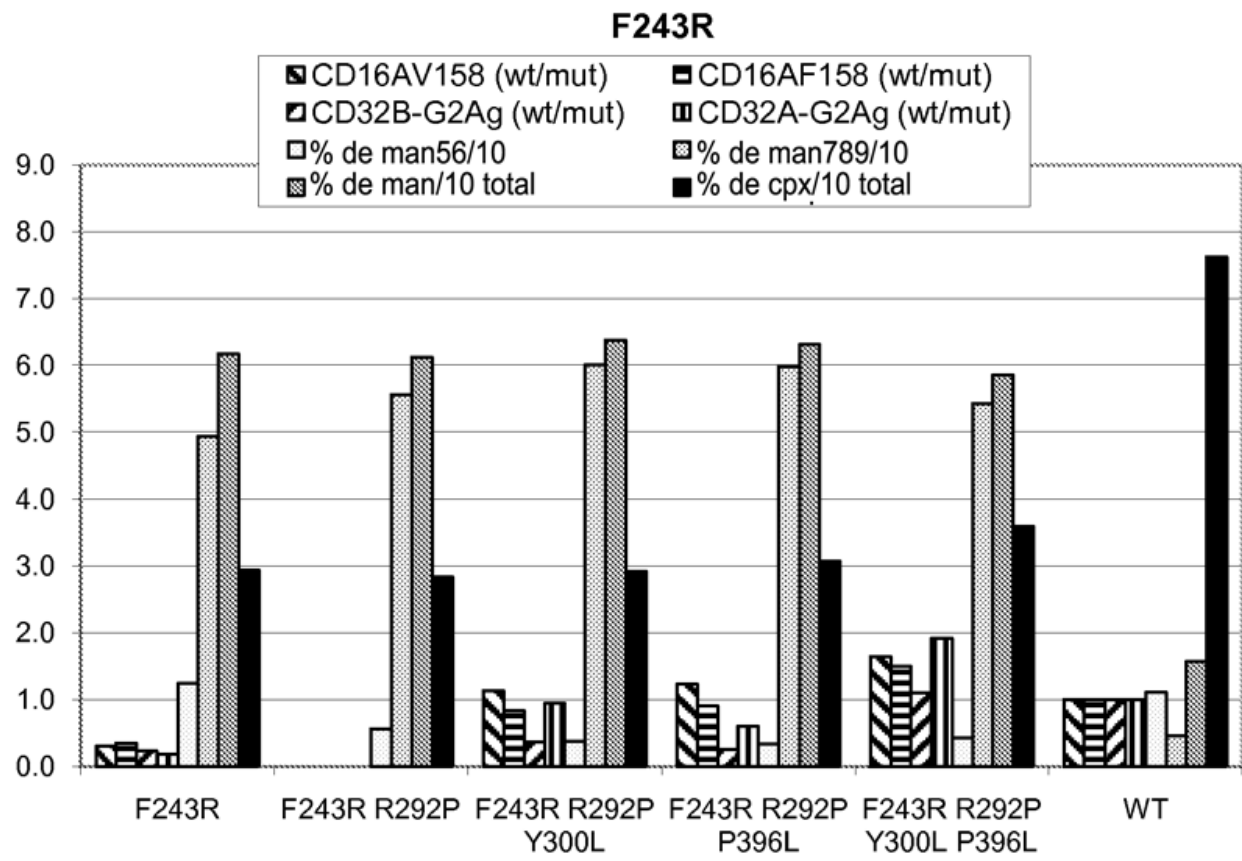


Figura 47

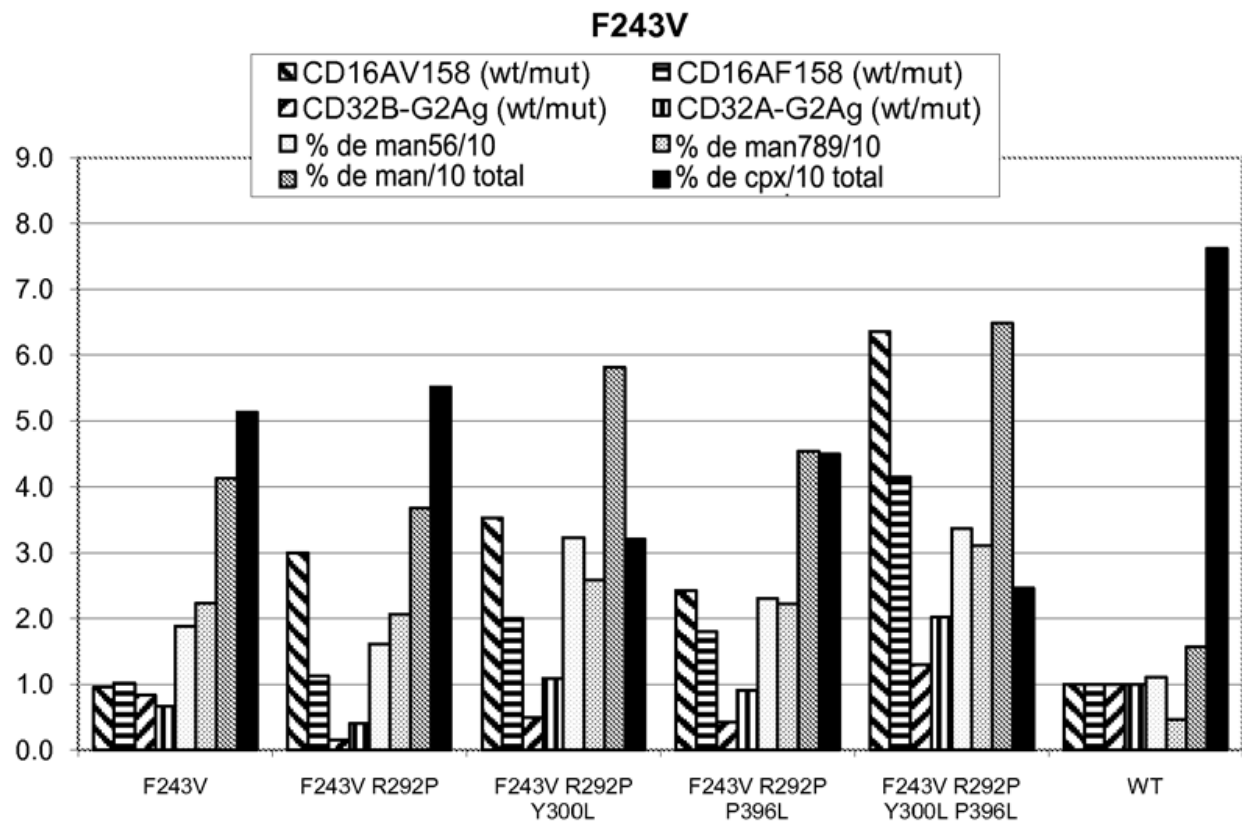


Figura 48