

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 076**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2017 PCT/EP2017/066791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18007453**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2017 E 17739229 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3481865**

54 Título: **Mutantes de Fc con actividad funcional mejorada**

30 Prioridad:

06.07.2016 FR 1656463

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

11.04.2024

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Tour W - 102 Terrasse Boieldieu, 19ème Étage
92800 Puteaux, FR**

72 Inventor/es:

MONNET, CÉLINE

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 965 076 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

Mutantes de Fc con actividad funcional mejorada

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una región Fc mutada y que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionados entre FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) y FcγRIIb (CD32b).

10 **[0002]** Los anticuerpos terapéuticos y las proteínas de fusión Fc se utilizan hoy en día para tratar diversas enfermedades, como la artritis reumatoide, la psoriasis, la esclerosis múltiple y muchas formas de cáncer. Los anticuerpos terapéuticos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una única línea celular productora de anticuerpos, que muestra idéntica especificidad para un único antígeno.

15 **[0003]** El efecto terapéutico de los anticuerpos dirigidos contra antígenos de membrana depende en particular del reclutamiento de células efectoras que expresen receptores para el fragmento cristizable del anticuerpo ("receptores Fc"). Los receptores Fc son proteínas presentes en la superficie de determinadas células que contribuyen a las funciones del sistema inmunitario, en particular las células NK (asesinas naturales), los macrófagos, los neutrófilos y los mastocitos. Existen varios tipos, clasificados según el tipo de anticuerpo que reconocen: los receptores Fc gamma (FcγR) se unen a IgG, los receptores Fc alfa (FcαR) se unen a IgA y los receptores Fc épsilon (FcεR) se unen a IgE.

20

[0004] La unión del receptor Fc a la región Fc de un anticuerpo desencadena diferentes mecanismos en función de la naturaleza de la célula en la que se expresa el receptor. La actividad funcional de los anticuerpos está mediada por la unión del fragmento Fc a los receptores Fc. En vista de la importancia de los mecanismos ligados a la unión de los receptores Fc a los anticuerpos, sería especialmente ventajoso disponer de variantes con una afinidad modificada, preferiblemente aumentada, por los receptores Fc y, en particular, con una actividad funcional mediada por Fc mejorada (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos).

25

30 **[0005]** El documento WO2014/140322 describe variantes de Fc con diferentes mutaciones. Estas incluyen sustituciones que aumentan la afinidad por diferentes receptores FcγR.

[0006] El demandante ahora ha desarrollado fragmentos Fc específicos con afinidad mejorada por los receptores Fc, en particular por al menos un receptor Fc seleccionado entre FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRI (CD64) y el complemento C1q. Ventajosamente, dichos fragmentos Fc presentan una única mutación que permite un control óptimo del impacto de dicha mutación sobre la unión del fragmento Fc a al menos uno de los receptores Fc y/o sobre sus actividades efectoras. Alternativamente, dichos fragmentos pueden incluir al menos una mutación adicional que les confiera propiedades ventajosas, como una mayor unión al FcRn y/o una mayor semivida. Estos fragmentos pueden utilizarse en terapia para mejorar la eficacia del producto que los contiene.

35

40

LEYENDA DE LAS FIGURAS**[0007]**

45 La **figura 1** muestra alineaciones de secuencias de IgG1 humana nativa referidas a las posiciones 216 a 447 (según el índice EU) con las secuencias correspondientes de IgG2 humana (SEQ ID NO: 7), IgG3 humana (SEQ ID NO: 8) e IgG4 humana (SEQ ID NO: 9). Las secuencias IgG1 se refieren al alotipo G1m1,17 (SEQ ID NO: 6) y al alotipo G1m3 (SEQ ID NO: 10). El dominio "bisagra inferior CH2-CH3" de la IgG1 comienza en la cisteína 226 (véase la flecha). El dominio CH2 está resaltado en gris y el dominio CH3 en cursiva.

50 La **figura 2** muestra las formas G0, G0F, G1 y G1F de las estructuras de glicanos que probablemente estén presentes en los fragmentos Fc de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

55 **[0008]** La presente invención se refiere a una variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) y FcγRIIb (CD32b) en comparación con la del polipéptido parental, caracterizada porque comprende las mutaciones definidas en la reivindicación 1.

60 **[0009]** Dicha variante de un polipéptido parental se denomina "variante según la invención" en la presente solicitud.

[0010] A lo largo de esta solicitud, la numeración de los residuos en la región Fc es la de la cadena pesada de la inmunoglobulina según el índice EU o su equivalente en Kabat et al. (Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1991). La expresión

"índice EU o su equivalente en Kabat" se refiere a la numeración EU de los residuos del anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Esto se ilustra en el sitio web de IMGT (<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/HuIGHGnber.html>).

- 5 **[0011]** Los FcR permiten a las células inmunitarias aprovechar la especificidad de los anticuerpos que se unen a ellas para dirigir sus funciones celulares hacia los antígenos y agentes patógenos específicos de ese anticuerpo.
- [0012]** Los FcyR representan el grupo más diverso de FcR y son los principales mediadores de la función de los anticuerpos en el organismo. Existen tres familias de FcyR humanos:
- 10 - FcyRI (CD64);
- FcyRII (CD32); y
- FcyRIII (CD16).
- 15 **[0013]** Tres de ellos (FcyRI, FcyRIIa, FcyRIIIa) son receptores activadores, que difieren en sus afinidades de unión y expresión celular.
- [0014]** El receptor FcyRIIIa (CD16a) está implicado en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y presenta un polimorfismo V/F en la posición 158. El receptor FcyRIIa (CD32a) interviene en la activación plaquetaria y la fagocitosis; presenta un polimorfismo H/R en la posición 131. El receptor FcyRI (CD64) también participa en los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de fagocitosis.
- 20 **[0015]** Por último, el receptor FcyRIIb (CD32b) participa en la inhibición de la actividad celular. Entre los receptores Fc definidos en el contexto de la invención, el complemento C1q está implicado en la actividad CDC o citotoxicidad dependiente del complemento.
- [0016]** Por "polipéptido" o "proteína" entendemos una secuencia que comprende al menos 100 aminoácidos unidos covalentemente.
- 30 **[0017]** Por "aminoácido" entendemos uno de los 20 aminoácidos naturales o análogos no naturales.
- [0018]** El término "posición" se refiere a una posición en la secuencia de un polipéptido. Para la región Fc, las posiciones se numeran según el índice EU o su equivalente en Kabat.
- 35 **[0019]** El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido habitual. Corresponde a un tetrámero que comprende al menos una región Fc y dos regiones variables. Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos totalmente humanos. La parte aminoterminal de cada cadena pesada comprende una región variable de unos 100 a 110 aminoácidos responsable del reconocimiento del antígeno. En cada región variable, tres bucles se unen para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de la complementariedad (en lo sucesivo, "CDR"). La parte carboxiterninal de cada cadena pesada define una región constante responsable principalmente de la función efectora.
- 40 **[0020]** Las IgG tienen varias subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las subclases de IgM incluyen IgM1 e IgM2. Por "isotipo" se entiende una de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de las inmunoglobulinas humanas son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.
- 50 **[0021]** Las IgG de longitud completa son tetrámeros y constan de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par que tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera que comprende los dominios VL y CL, y cada cadena pesada que comprende los dominios VH, C_γ1 (también conocido como CH1), C_γ2 (también conocido como CH2) y C_γ3 (también conocido como CH3). Para la IgG1 humana, "CH1" se refiere a las posiciones 118 a 215, "CH2" a las posiciones 231 a 340 y "CH3" a las posiciones 341 a 447 según el índice EU o su equivalente en Kabat. La cadena pesada de la IgG también incluye un dominio bisagra N-terminal flexible que se refiere a las posiciones 216 a 230 en el caso de la IgG1. La zona inferior de la bisagra se refiere a las posiciones 226 a 230 según el índice EU o su equivalente en Kabat.
- 55 **[0022]** Por "región variable" se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes VK, VX y/o VH que componen las cadenas kappa, lambda y pesada de la inmunoglobulina, respectivamente. Las regiones variables incluyen las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) y las Regiones Marco (FR).
- 60 **[0023]** El término "Fc" o "región Fc" se refiere a la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de región constante de inmunoglobulina (CH1). Fc se refiere a los dos últimos dominios (CH2 y CH3) de la

- región constante de la IgG1, y a la bisagra N-terminal flexible de estos dominios. Para la IgG1 humana, la región Fc corresponde al residuo C226 hasta su extremo carboxiterminal, es decir, los residuos desde la posición 226 hasta la 447, donde la numeración se corresponde con el índice EU o su equivalente en Kabat. La región Fc utilizada también puede incluir parte de la región bisagra superior, situada entre las posiciones 216 a 226 según el índice EU o su equivalente en Kabat; en este caso, la región Fc utilizada corresponde a los residuos de la posición 216 a 447, 217 a 447, 218 a 447, 219 a 447, 220 a 447, 221 a 447, 222 a 447, 223 a 447, 224 a 447 o 225 a 447, donde la numeración se corresponde con el índice EU o su equivalente en Kabat. Preferiblemente en este caso, la región Fc utilizada corresponde a los residuos de la posición 216 a 447, donde la numeración se corresponde con el índice EU o su equivalente en Kabat. Preferiblemente, la región Fc utilizada se selecciona entre las secuencias SEQ ID NO: 1 a 10.
- 10 Preferiblemente, el fragmento Fc utilizado se selecciona entre las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5. Preferiblemente, el fragmento Fc del anticuerpo parental tiene la secuencia SEQ ID NO: 1. Las secuencias representadas en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5 están libres de una región bisagra N-terminal. Las secuencias representadas en las SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 y 10 corresponden respectivamente a las secuencias representadas en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5 con sus regiones bisagra N-terminal. Asimismo, en una realización particular, el fragmento
- 15 Fc del anticuerpo parental se selecciona entre las secuencias SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 y 10. Preferentemente, el fragmento Fc del anticuerpo parental tiene una secuencia correspondiente a las posiciones 1-232, 2-232, 3-232, 4-232, 5-232, 6-232, 7-232, 8-232, 9-232, 10-232 u 11-232 de la secuencia SEQ ID NO: 6.

- [0024]** "Polipéptido parental" se refiere a un polipéptido de referencia. Dicho polipéptido parental puede ser de origen natural o sintético. En el contexto de la presente invención, el polipéptido parental comprende una región Fc, denominada "región Fc parental". Esta región Fc puede seleccionarse entre el grupo de regiones Fc de tipo silvestre, sus fragmentos y mutantes. Preferiblemente, el polipéptido parental comprende una región Fc humana, preferiblemente una región Fc de una IgG1 humana. El polipéptido parental puede incluir modificaciones de aminoácidos preexistentes en la región Fc (por ejemplo, un mutante Fc) en relación con las regiones Fc de tipo
- 25 silvestre. Ventajosamente, el polipéptido parental es una región Fc aislada (es decir, un fragmento Fc como tal), una secuencia derivada de una región Fc aislada, un anticuerpo, una proteína de fusión que comprende una región Fc o un conjugado Fc, sin que esta lista sea exhaustiva. Por "secuencia derivada de una región Fc aislada", entendemos una secuencia que comprende al menos dos regiones Fc aisladas unidas entre sí, como un scFc (Fc de cadena simple) o un multímero Fc. Por "proteína de fusión que comprende una región Fc" se entiende una secuencia polipeptídica
- 30 fusionada a una región Fc, dicha secuencia polipeptídica que se selecciona preferentemente entre las regiones variables de cualquier anticuerpo, las secuencias de unión de un receptor a su ligando, las moléculas de adhesión, los ligandos, las enzimas, las citocinas y las quimiocinas. "Conjugado Fc" se refiere a un compuesto que resulta del acoplamiento químico de una región Fc con un compañero de conjugación. El compañero de conjugación puede ser proteínico o no proteínico. La reacción de acoplamiento generalmente utiliza grupos funcionales en la región Fc y el
- 35 compañero de conjugación. En la técnica anterior se conocen varios grupos de enlace que son adecuados para la síntesis de un conjugado; por ejemplo, son bien conocidos los grupos de enlace homo o heterobifuncionales (véase el catálogo de Pierce Chemical Company, 2005-2006, sección técnica sobre agentes reticulantes, páginas 321-350). Los compañeros de conjugación adecuados incluyen proteínas terapéuticas, marcadores, agentes citotóxicos como agentes quimioterapéuticos, toxinas y sus fragmentos activos. Ventajosamente, el polipéptido parental, y por tanto la
- 40 variante según la invención, consta de una región Fc.

[0025] Ventajosamente, el polipéptido parental, y por tanto la variante según la invención, es un anticuerpo.

- [0026]** Por último, el polipéptido parental, y por tanto la variante según la invención, es preferentemente un
- 45 polipéptido producido en la leche de animales transgénicos.

- [0027]** "Mutación" se refiere a un cambio en al menos un aminoácido de la secuencia de un polipéptido, en particular un cambio en al menos un aminoácido de la región Fc del polipéptido parental. El polipéptido mutado así obtenido es un polipéptido variante; es una variante según la invención. Dicho polipéptido comprende una región Fc
- 50 mutada en comparación con el polipéptido parental. Preferiblemente, la mutación es una sustitución, inserción o delección de al menos un aminoácido. "Sustitución" se refiere a la sustitución de un aminoácido en una posición determinada de una secuencia polipeptídica parental por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución N434S se refiere a un polipéptido variante, en este caso uno en el que la asparagina en la posición 434 se sustituye por serina. "Inserción de aminoácidos" o "inserción" se refiere a la adición de un aminoácido en una posición concreta de una secuencia
- 55 polipeptídica parental. Por ejemplo, la inserción G>235-236 se refiere a una inserción de glicina entre las posiciones 235 y 236. "Supresión de aminoácidos" o "delección" se refiere a la supresión de un aminoácido en una posición concreta de una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, E294del se refiere a la delección de ácido glutámico en la posición 294. Preferiblemente, se utiliza la siguiente formulación de la mutación: el término "434S" o "N434S" significa que el polipéptido parental contiene asparagina en la posición 434, que se sustituye por serina en la variante.
- 60 En el caso de una combinación de sustituciones, el formato preferido es el siguiente: "259I/315D/434Y" o "V259I/N315D/N434Y". Esto significa que hay tres sustituciones en la variante, en las posiciones 259, 315 y 434, y que el aminoácido en la posición 259 del polipéptido parental, valina, se sustituye por isoleucina, el aminoácido en la posición 315 del polipéptido parental, asparagina, se sustituye por ácido aspártico y el aminoácido en la posición 434 del polipéptido parental, asparagina, se sustituye por tirosina.

[0028] La variante según la invención presenta una mayor actividad funcional mediada por la región Fc en comparación con la del polipéptido parental.

5 **[0029]** La "actividad funcional mediada por la región Fc" se refiere en particular a las funciones efectoras. La actividad funcional mediada por la región Fc incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), la actividad de endocitosis, la secreción de citocinas o una combinación de dos o más de estas actividades. Preferiblemente, la actividad funcional mediada por la región Fc considerada en la invención se selecciona entre
 10 ADCC, ADCP, CDC y sus combinaciones. Esta actividad funcional puede evaluarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica anterior. La actividad funcional mediada por la región Fc de la variante según la invención se incrementa en relación con la del polipéptido parental, típicamente en una relación de al menos 2, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10, preferentemente superior a 15, preferentemente superior a 20, preferentemente superior a 25, y preferentemente superior a 30.

15 **[0030]** Preferiblemente, dicha región Fc mutada tiene una mayor afinidad por al menos uno de los FcR. Preferiblemente, la afinidad se incrementa, en relación con la del Fc parental, en una relación al menos igual a 2, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10, preferentemente superior a 15, preferentemente superior a 20, preferentemente superior a 25, y preferentemente superior a 30. En otras palabras, la afinidad de la región Fc
 20 mutada por un FcR es mayor que la del polipéptido parental.

[0031] La afinidad de un polipéptido que comprende una región Fc por un FcR puede evaluarse por procedimientos bien conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden determinar la afinidad (Kd) utilizando la resonancia de plasmón superficial (SPR). Como alternativa, un experto en la materia puede
 25 realizar una prueba ELISA adecuada. Se puede utilizar un ELISA apropiado para comparar la fuerza de unión del Fc parental y del Fc mutado. Se comparan las señales detectadas específicas del Fc mutado y del Fc parental. La afinidad de unión puede determinarse evaluando polipéptidos enteros o evaluando regiones Fc aisladas de ellos.

[0032] También se describe una región Fc mutada de la variante que comprende de 1 a 20 mutaciones en
 30 relación con el polipéptido parental, preferiblemente de 2 a 20 mutaciones. La expresión "de 1 a 20 modificaciones de aminoácidos" abarca 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mutaciones de aminoácidos. Puede comprender de 1 a 15 mutaciones, preferiblemente de 2 a 15 mutaciones, preferiblemente de 1 a 10 mutaciones con respecto al polipéptido parental, más preferiblemente de 2 a 10 mutaciones.

35 **[0033]** La variante descrita se caracteriza porque la mutación se selecciona entre una inserción, una sustitución, preferentemente puntual, y una delección.

[0034] La variante descrita comprende al menos una mutación i) seleccionada entre V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R291I, R291L, R291S, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.
 40
 45

[0035] También se describe una variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una afinidad alterada, preferentemente aumentada, por al menos uno de los receptores de fragmentos Fc (FcR) seleccionados entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a), y FcγRIIb (CD32b) en relación con la del polipéptido parental, que comprende una única mutación i) seleccionada entre V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R291I, R291L, R291S, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.
 50
 55
 60

[0036] Así, también se describe una variante que comprende una única mutación i) seleccionada entre V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R291I, R291L, R291S, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.

S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0037] También se describe una variante Fc que comprende al menos dos mutaciones i), dichas mutaciones que se seleccionan entre i) V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones no sean idénticas.

[0038] También se describe una variante Fc que comprende al menos tres mutaciones i), dichas mutaciones i) que se seleccionan entre V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones no sean idénticas.

[0039] También se describe una variante Fc que comprende al menos cuatro mutaciones i), dichas mutaciones i) que se seleccionan entre V240H, V240I, V240M, V240N, V240S, F241H, F241Y, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, F243L, F243S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y296H, Y296W, S298A, S298R, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones no sean idénticas.

[0040] En una realización, la variante según la invención tiene mayor afinidad por el receptor FcγRIIIa (CD16a). En esta realización particular, dicha variante comprende al menos la mutación i) Y296W de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0041] También se ha descrito una variante con mayor afinidad por el receptor FcγRIIa (CD32a). En esta realización particular, dicha variante comprende al menos una mutación i) seleccionada entre F241H, F241Y, F243L, L242A, L242F, L242G, L242H, L242I, L242K, L242P, L242S, L242T, L242V, V240H, V240I, V240M, V240S, E258G, E258I, E258R, E258M, E258Q, E258Y, S267A, S267Q, S267V, T260A, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V259C, V259I, V259L, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, K290D, K290E, K290G, K290H, K290L, K290N, K290Q, K290R, K290S, K290Y, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, R292I, R292L, R301A, R301P, R301S, S304T, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303Y, V305A, V305F, V305L, V305R, V305S, Y300I, Y300V o Y300W; la numeración es la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0042] También se ha descrito una variante con mayor afinidad por el receptor FcγRIIb (CD32b). En esta realización particular, dicha variante comprende al menos una mutación i) seleccionada entre E258R, E258Y, V262A, S267A, S267Q, S267V, V264S, V266L, V266M, K290R, R301A, R301M, S304T, V302A, V302L, V302R, V303S, V305A, V305F, V305I, V305R, Y300V de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0043] Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza porque el fragmento Fc del polipéptido parental ya comprende al menos:

(ii) una mutación seleccionada entre 378V, 378T, 434Y y 434S; y

(iii) al menos una mutación seleccionada entre 226G, P228L, P228R, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D,

330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S,
siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones (ii) y (iii)
no se produzcan en los mismos aminoácidos.

5 **[0044]** Así, según un aspecto particular, la invención se refiere a una variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcyRIIIa (CD16a), FcyRIIIa (CD32a) y FcyRIIIb (CD32b) en comparación con la del polipéptido parental, caracterizada porque comprende al menos la mutación i) Y296W de dicho fragmento Fc; y porque comprende además al menos:

10

(ii) una mutación seleccionada entre 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(iii) al menos una mutación seleccionada entre 226G, P228L, P228R, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S, con la condición de que las mutaciones (ii) y (iii) no se produzcan en los mismos aminoácidos,

15

siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat,

[0045] En una realización particular, dicha variante comprende al menos una combinación de mutaciones seleccionada del grupo que consiste en 226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/264E/434S, 230T/389T/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/434S, 250A/389K/434Y, 2591/315D/434Y, 264E/378T/396L,
20 264E/378V/416K, 264E/378V/434S, 264E/396L/434S, 294del/307P/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y,

entendiéndose que la numeración de las posiciones de aminoácidos del fragmento Fc es la del índice EU o su equivalente en Kabat.

25 **[0046]** En una realización particular, dicha variante comprende además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R,

30 entendiéndose que la numeración de las posiciones de aminoácidos del fragmento Fc es la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0047] En una realización particular, dicha variante comprende al menos una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y,
35 315D/330V/361D/378V/434Y, 2591/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 294del/307P/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y,
40 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 3081/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y
45 230T/303A/322R/389T/404L/434S, entendiéndose que la numeración de las posiciones de aminoácidos del fragmento Fc es la del índice EU o su equivalente en Kabat.

[0048] En una realización particular, la variante según la invención comprende al menos una mutación i), preferentemente la mutación única i) Y296W de dicho fragmento Fc; y una combinación de mutaciones ii) y iii) seleccionadas entre 315D/330V/361D/378V/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 2591/315D/434Y, 256N/378V/383N/434Y.

[0049] Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza porque el fragmento Fc del polipéptido parental ya comprende al menos:

55

(iv) una mutación seleccionada entre 307N, 326E, 326T, 334N, 334R, 352L, 378V, 378T, 394P, 396L, 397M, 421T; y

60

(v) al menos una mutación seleccionada entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267N, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 315D, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A, 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378V, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 397M, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N,

siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones (iv) y (v) no se produzcan en los mismos aminoácidos.

- [0050]** Así, según un aspecto particular invención se refiere a una variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcyRIIIa (CD16a), FcyRIIIa (CD32a) y FcyRIIIb (CD32b) en comparación con la del polipéptido parental, caracterizada porque comprende al menos la mutación i) Y296W de dicho fragmento Fc; y porque comprende además al menos:
- 10 (iv) una mutación seleccionada entre 307N, 326E, 326T, 334N, 334R, 352L, 378V, 378T, 394P, 396L, 397M, 421T; y
- (v) al menos una mutación seleccionada entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267N, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 315D, 316D,
- 15 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A, 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378V, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 397M, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N,
- 20 siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones (i), (iv) y (v) no se produzcan en los mismos aminoácidos.
- [0051]** Preferiblemente, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 396L y 397M. Preferiblemente, el polipéptido también comprende una mutación seleccionada entre 248E, 326T, 333G y 423Y.
- 25 **[0052]** Preferentemente, la mutación (v) según la invención se selecciona de 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 393I, 394P, 396L, 397I, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N.
- 30 **[0053]** En una realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 396L y 397M y la mutación (v) se selecciona entre 248E, 316D, 326E, 333G, 378T, 396L y 421T.
- [0054]** En otra realización, la mutación (iv) es 378V y la mutación (v) se selecciona entre 298N y 336T.
- 35 **[0055]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 396L y 397M; y la mutación (v) se selecciona entre 231V, 286I, 286Y, 290E, 315D, 334N, 352S, 361H, 366A, 378T, 397M, 412M, 421T y 423Y.
- [0056]** En otra realización, la mutación (iv) es 378V; y la mutación (v) se selecciona entre 248E, 308A, 334R, 447N.
- 40 **[0057]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 326E, 397M, 334N y 396L; y la mutación (v) se selecciona entre 316D, 397M, 334N, 248E, 231V, 246R, 336T, 421T, 361H, 366A, 439R, 290E, 394P, 307P, 378V, 378T, 286I, 286Y y 298N.
- 45 **[0058]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 326E, 397M, 307N, 394P, 326T, 396L y 334N; y la mutación (v) se selecciona entre 316D, 334R, 334N, 323I, 231V, 246R, 336T, 378T, 286Y, 286I, 352S, 383R, 359A, 421T, 361H, 315D, 366A, 290E, 307P y 439R. Preferentemente, la mutación (v) se selecciona entre: 316D, 334R, 334N, 323I, 231V, 246R, 336T, 378T, 286Y, 286I, 352S, 383R, 359A, 421T, 361H, 366A, 290E, 307P y 439R.
- 50 **[0059]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 326E, 326T, 378V, 397M, 352L, 394P, 396L y 421T; y la mutación (v) se selecciona entre 316D, 334R, 248E, 334N, 418P, 231V, 320E, 402D, 359A, 383R, 421T y 361H.
- 55 **[0060]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 378T, 396L, 421T, 334R y 326E; y la mutación (v) se selecciona entre 361H, 290E, 316D, 248E, 410R, 421T, 334R, 394P, 307P, 447N, 378V, 284L, 421T, 396L, 286I, 315D y 397M.
- [0061]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 326E, 397M, 334N y 396L; y la mutación (v) se selecciona entre 316D, 397M, 334N, 248E, 231V, 246R, 336T, 421T, 361H, 366A, 439R, 290E, 394P, 307P, 378V, 378T, 286I, 286Y y 298N.
- 60 **[0062]** En otra realización, la mutación (iv) se selecciona de 326E, 326T, 352L, 378V, 378T, 396L, 397M, 421T, 334N, 334R, 307N y 394P, y la mutación (v) consiste en al menos 2 mutaciones seleccionadas entre 226Y,

227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267N, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 315D, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378V, 5 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 397M, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N.

[0063] Preferentemente, al menos las 2 mutaciones (v) se eligen entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 10 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 15 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P, et 447N.

[0064] Preferentemente, la región Fc mutada del polipéptido según la invención comprende una combinación de mutaciones seleccionada entre las combinaciones:

20 K320E/T394P/G402D;
K290E/K320E/T350A/P396L;
T359A/S383R/V397M.

[0065] Según otro aspecto de la invención, se hace uso de una composición que comprende una pluralidad de 25 variantes de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, que tienen todas sustancialmente la misma secuencia, dichas variantes que comprenden fragmentos Fc que, tomados en su conjunto, exhiben un perfil de glicosilación particular.

[0066] Según un aspecto particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en 30 el contexto de la invención poseen en su sitio de glicosilación (Asn 297, siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat) N-glicanos, caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un nivel de fucosilación inferior al 65 %, preferentemente inferior al 60 %, preferentemente inferior al 55 %, preferentemente inferior al 50 %, preferentemente inferior al 45 %, preferentemente inferior al 40 %, preferentemente inferior al 35 %, preferentemente inferior al 30 %, preferentemente inferior al 25 %, y preferentemente inferior al 20 %. Según otro 35 aspecto más, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en el contexto de la invención poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen una estructura glicánica de tipo biantenada, con cadenas cortas, baja sialilación, con N-acetilglucosaminas terminales no intercalantes.

40 **[0067]** Según un aspecto más particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en el contexto de la invención poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, siendo el contenido de las formas G0F+G1F inferior al 50 %.

45 **[0068]** Según otro aspecto más particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en el contexto de la invención poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, siendo el contenido en fucosa inferior al 65 %.

50 **[0069]** Según un aspecto aún más particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en el contexto de la invención poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un contenido inferior al 40 % para las formas G1F+G0F.

[0070] Según un aspecto más particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada 55 en el contexto de la invención tienen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), teniendo dichos N-glicanos de los fragmentos Fc un nivel de fucosilación igual al 0 %. La invención proporciona así una composición que comprende variantes de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, los fragmentos Fc de dichas variantes que tienen en el sitio de glicosilación Asn297 N-glicanos caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc están libres de fucosa.

60 **[0071]** Asimismo, según un aspecto particular, los fragmentos Fc de las variantes dentro de una composición utilizada en el contexto de la invención poseen N-glicanos en el sitio de glicosilación Asn297, caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un grado de fucosilación de entre el 20 % y el 55 %. En particular, la invención proporciona una composición que comprende variantes de un polipéptido parental que comprende un

fragmento Fc, los fragmentos Fc de dichas variantes que tienen N-glicanos en el sitio de glicosilación Asn297, caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un grado de fucosilación de entre el 20 % y el 50 %, entre el 25 % y el 55 %, entre el 25 % y el 50 %, entre el 20 % y el 45 % o entre el 25 y el 45 %.

- 5 **[0072]** Según un aspecto más particular, una composición útil según la invención comprende variantes de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, los fragmentos Fc de dichas variantes que poseen en el sitio de glicosilación Asn297 N-glicanos, caracterizados porque dichos N-glicanos de los fragmentos Fc tienen un contenido superior al 60 %, preferentemente superior al 80 %, para las formas G0+G1+G0F+G1F, siendo el contenido de las formas G0F+G1F inferior al 50 %, preferentemente inferior al 40 %, o inferior al 30 %.
- 10 **[0073]** Según otro aspecto más específico, los N-glicanos de los fragmentos Fc dentro de la composición tienen un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, siendo el contenido de fucosa inferior al 65 %.
- [0074]** Según otro aspecto más específico, los N-glicanos de los fragmentos Fc dentro de la composición tienen un contenido inferior al 50 % para las formas G1F+G0F, preferiblemente inferior al 40 % o al 30 %.
- 15 **[0075]** Las formas G0, G0F, G1 y G1F se seleccionan entre las que se muestran en la figura 2.
- [0076]** Ventajosamente, los N-glicanos de los fragmentos Fc dentro de la composición variante tienen un contenido medio de ácido siálico inferior al 25 %, 20 %, 15 % o 10 %, preferiblemente del 5 %, 4 %, 3 % o 2 %.
- [0077]** Una composición que puede utilizarse en el contexto de la invención comprende variantes de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, los fragmentos Fc de dichas variantes que tienen en su sitio de glicosilación (Asn 297) N-glicanos, dichos N-glicanos de los fragmentos Fc que presentan una estructura de glicano de tipo biantenado, con cadenas cortas, baja sialilación y baja fucosilación, teniendo los N-glicanos, por ejemplo, un contenido superior al 60 % para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, y una fucosilación inferior al 60 %, preferentemente inferior al 55 %, teniendo los N-glicanos, por ejemplo, un contenido inferior al 50 % de las formas G0F + G1F y una fucosilación inferior al 55 %.
- 25 **[0078]** En una realización particular, los fragmentos Fc según la invención tienen estructuras de glicano como se describe en la solicitud de patente WO01/77181.
- [0079]** Según una realización ventajosa, los fragmentos Fc utilizados en la invención comprenden al menos una mutación de un aminoácido con respecto a un fragmento Fc parental, y poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), teniendo dichos N-glicanos de los fragmentos Fc un nivel de fucosilación inferior al 65 %, preferiblemente inferior al 60 %, preferiblemente inferior al 55 %, preferiblemente inferior al 50 %, preferiblemente inferior al 45 %, preferiblemente inferior al 40 %, preferiblemente inferior al 35 %, preferiblemente inferior al 30 %, preferiblemente inferior al 25 %, y preferiblemente inferior al 20 %. Preferentemente, los fragmentos Fc presentan al menos la mutación i) Y296W de dicho fragmento Fc; la numeración es la del índice EU o su equivalente en Kabat, y también poseen N-glicanos en su sitio de glicosilación (Asn 297), teniendo un nivel de fucosilación inferior al 55 %, preferentemente inferior al 50 %, preferentemente inferior al 45 %, preferentemente inferior al 40 %, preferentemente inferior al 35 %, preferentemente inferior al 30 %, preferentemente inferior al 25 %, y preferentemente inferior al 20 %.
- 40 **[0080]** También se describe que los fragmentos Fc de la composición según la invención llevan una mutación i) seleccionada entre V240H, F241H, F241Y, L242H, L242P, L242T, E258G, E258R, E258M, E258Q, E258Y, V259C, V259I, V259L, T260H, T260I, T260M, T260N, T260R, T260S, T260W, V262A, V262S, V263T, V264L, V264S, V264T, V266L, V266M, S267A, S267Q, S267V, K290L, K290N, K290R, P291G, P291Q, P291R, R292I, R292L, E293A, E293D, E293G, E293M, E293Q, E293S, E293T, E294A, E294G, E294P, E294Q, E294R, E294T, E294V, Q295I, Q295M, Y300I, Y300V, Y300W, R301A, R301 M, R301P, R301S, V302A, V302F, V302L, V302M, V302R, V302S, V303S, V303Y, S304T, V305A, V305F, V305I, V305L, V305R y V305S, de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat, y además poseen en su sitio de glicosilación (Asn 297) N-glicanos que tienen un nivel de fucosilación inferior al 55 %, preferentemente inferior al 50 %, preferentemente inferior al 45 %, preferentemente inferior al 40 %, preferentemente inferior al 35 %, preferentemente inferior al 30 %, preferentemente inferior al 25 %, y preferentemente inferior al 20 %.
- 55 **[0081]** Ventajosamente, los fragmentos Fc con glicosilación modificada en el sitio de glicosilación en la posición 297, en particular baja fucosilación, presentan una mayor unión de dicho fragmento a los receptores Fcγ (FcyR), en particular el receptor FcyRIIIa (CD16a).
- 60 **[0082]** Preferentemente, dichos fragmentos Fc tienen una afinidad por CD16a al menos igual a $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, al menos igual a $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ o $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, según se determine mediante análisis de Scatchard o BIAcore (tecnología basada en resonancia de plasmón superficial sin marcadores).
- [0083]** Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza porque comprende de 1 a 20 mutaciones

de dicho fragmento Fc, preferentemente de 1 a 10 mutaciones.

[0084] Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza porque el polipéptido parental comprende un fragmento Fc parental que es un fragmento Fc humano, preferentemente un fragmento Fc de una IgG1 humana o una IgG2 humana.

[0085] Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza porque se selecciona entre un fragmento Fc aislado, una secuencia derivada de un fragmento Fc aislado, un anticuerpo y una proteína de fusión que comprende un fragmento Fc.

[0086] Preferentemente, la variante según la invención se caracteriza por ser un anticuerpo.

[0087] La presente invención también se refiere a una composición polipeptídica según la invención.

[0088] La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (1) una variante según la invención o una composición como la descrita en el párrafo anterior, y (2) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0089] Otro objeto de la presente invención es la variante según la invención o la composición como se ha descrito anteriormente, para su uso como medicamento.

[0090] Como se ha indicado anteriormente, el polipéptido parental, y por tanto la variante según la invención, es un anticuerpo. En este caso, el anticuerpo puede estar dirigido contra un antígeno seleccionado entre un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, una toxina, una citocina de membrana o circulante y un receptor de membrana.

[0091] Cuando el anticuerpo está dirigido contra un antígeno tumoral, es particularmente adecuado para su uso en el tratamiento del cáncer. Por "cáncer" se entiende cualquier estado fisiológico caracterizado por una proliferación celular anormal. Algunos ejemplos de cánceres son, entre otros, carcinomas, linfomas, blastomas, sarcomas (incluidos los liposarcomas), tumores neuroendocrinos, mesoteliomas, meningiomas, adenocarcinomas, melanomas, leucemias y neoplasias linfoides.

[0092] Cuando el anticuerpo está dirigido contra un antígeno vírico, es especialmente adecuado para tratar infecciones víricas. Las infecciones víricas incluyen, entre otras, el VIH, el retrovirus, el virus Cocksackie, la viruela, la gripe, la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, el citomegalovirus, el rotavirus y los virus de la hepatitis B o C.

[0093] Cuando el anticuerpo está dirigido contra una toxina, es particularmente adecuado para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas, por ejemplo, infecciones por toxina tetánica, toxina diftérica, toxinas de ántrax de *Bacillus anthracis*, o en el tratamiento de infecciones por toxinas botulínicas, toxinas de la ricina y shigatoxinas, aunque esta lista no es exhaustiva.

[0094] Cuando el anticuerpo está dirigido contra una citocina, es particularmente adecuado para tratar enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Entre las enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes figuran la púrpura trombótica trombocitopénica (PTI), el rechazo de trasplantes u órganos, la enfermedad de injerto contra huésped, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, diversos tipos de esclerosis, el síndrome de Sjogren primario (o síndrome de Gougerot-Sjogren), polineuropatías autoinmunes como la esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, hepatitis autoinmune, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis gotosa, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, tiroiditis crónica de Hashimoto (hipotiroidismo), enfermedad de Adisson, hepatitis autoinmune, enfermedad de Basedow (hipotiroidismo), colitis ulcerosa, vasculitis como las vasculitis sistémicas asociadas a ANCA (anticuerpos anticitoplasmáticos de neutrófilos), citopenias autoinmunes y otras complicaciones hematológicas en adultos y niños, como la trombocitopenia autoinmune aguda o crónica, la anemia hemolítica autoinmune, la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), la enfermedad de la aglutinina fría, la hemofilia adquirida autoinmune; el síndrome de Goodpasture, nefropatía extramembranosa, trastornos cutáneos bullosos autoinmunes, miastenia gravis refractaria, crioglobulinemia mixta, psoriasis, artritis crónica juvenil, miositis inflamatoria, dermatomiositis y trastornos sistémicos autoinmunes en niños, incluido el síndrome antifosfolípido, enfermedad del tejido conjuntivo, inflamación autoinmune del pulmón, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuritis desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus, miastenia gravis, enfermedad inflamatoria autoinmune del ojo, neuromielitis óptica (enfermedad de Devie), esclerodermia, pénfigo, diabetes insulinoresistente, polimiositis, anemia de Biermer, glomerulonefritis, enfermedad de Wegener, enfermedad de Horton, periartitis nodosa y síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Still, policondritis atrófica, enfermedad de Behçet, gammapatía monoclonal, granulomatosis de Wegener, lupus, colitis ulcerosa, artritis psoriásica, sarcoidosis, colitis colágena, dermatitis herpetiforme, fiebre mediterránea familiar, glomerulonefritis con depósitos de IgA, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, oftalmía simpática, síndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter y síndrome uveomeningoencefálico.

[0095] También se incluyen otras enfermedades inflamatorias, como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la artritis séptica aguda, la artritis adyuvante, la encefalomiелitis alérgica, la rinitis alérgica, la vasculitis alérgica, alergia, asma, aterosclerosis, inflamación crónica debida a infecciones bacterianas o víricas crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cardiopatía coronaria, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, osteólisis inflamatoria, inflamación asociada a reacciones de hipersensibilidad aguda y retardada, inflamación asociada a tumores, lesiones nerviosas periféricas o enfermedades desmielinizantes, inflamación asociada a traumatismos tisulares como quemaduras e isquemia, inflamación debida a meningitis, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), fibrosis pulmonar, sepsis y choque séptico, síndrome de Stevens-Johnson, artritis indiferenciada y espondilitis indiferenciada.

10

[0096] En una realización particular de la invención, la enfermedad autoinmune es la púrpura trombótica idiopática (PTI) y la polirradiculoneuritis desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC).

[0097] Otro objeto de la presente invención es un proceso para producir una variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a), y FcγRIIb (CD32b) en relación con la del polipéptido parental, que comprende una etapa de mutación de al menos un aminoácido, siendo la mutación Y296W de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat, y siendo el procedimiento según la reivindicación 12.

20

[0098] El objeto de la presente invención es en particular un procedimiento para producir una variante de un polipéptido que comprende un fragmento Fc, presentando dicha variante una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) y FcγRIIb (CD32b), en comparación con la del polipéptido parental, una relación de al menos 2, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10, preferentemente superior a 15, preferentemente superior a 20, preferentemente superior a 25, preferentemente superior a 30, que comprende una etapa de mutación de al menos un aminoácido, siendo la mutación Y296W de dicho fragmento Fc; siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat, y siendo el procedimiento según la reivindicación 13.

30 **[0099]** Las secuencias descritas en esta solicitud pueden resumirse como sigue:

SEQ ID NO:	Proteína	Secuencia
1	Región Fc de la IgG1 humana G1m1,17 (residuos 226-447 según el índice EU o su equivalente en Kabat) sin la región bisagra superior N-terminal	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVFVHQQDWFNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTFPPSRDEFTKNQVSFTCFVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVFDSGDSFFFYSKFTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEAFHNHYTQKSFSFSPGK
2	Región Fc de la IgG2 humana sin la región bisagra N-terminal superior	CPPCPAPPVAGPSVFFFPKPKDTFMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFTVHQQDWFNGKEYKCKVSNKGFPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTFPPSREEMTKNQVSFTCFVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMFDSDGDSFFFYSKFTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEAFHNHYTQKSFSFSPGK
3	Región Fc de la IgG3 humana sin la región bisagra N-terminal superior	CPRCPAPEFFGGPSVFFFPKPKDTFMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSFTVHQQDWFNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTFPPSREEMTKNQVSFTCFVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMFDSDGDSFFFYSKFTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEAFHNRYTQKSFSFSPGK
4	Región Fc de la IgG4 humana sin la región bisagra N-terminal superior	CPSCPAPPEFFGGPSVFFFPKPKDTFMISRTPEVTCVWVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVETVEHQQDWENGKEYKCKVSNKGEPSSEIKTISKAKGQPREPQVYTFPPSQEEMTKNQVSFTCFVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVFDSGDSFFFYSRFTVDKSRWQEGNVFSVMSVMHEAFHNHYTQKSFSFSPGK

(continuación)

SEQ ID NO:	Proteína	Secuencia
5	Región Fc de la IgG1 humana G1m3 sin la región bisagra N-terminal superior	CPPCPAPEFFGGPSVFFFPPKPKDTFMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVFVTFHQDWFNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTFPPSREEMTKNQVSTCFVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVFSDSDGSFFFYSKFTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAFHNHYTQKSFSFSPGK
6	Región Fc de IgG1 humana G1m1,17 con la región bisagra N-terminal superior (residuos 216-447 según el índice EU o su equivalente en Kabat)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Región Fc de IgG2 humana con la región bisagra N-terminal superior	ERKCCVCEPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	Región Fc de IgG3 humana con la región bisagra N-terminal superior	ELKLTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	Región Fc de IgG4 humana con la región bisagra N-terminal superior	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
10	Región Fc de IgG1 humana G1m3 con la región bisagra N-terminal superior	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

EJEMPLOS

[0100] Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar diversas realizaciones de la invención.

5

Ejemplo 1: Producción de variantes de Fc según la invención mediante mutagénesis dirigida**1. Construcción de variantes de Fc:**

- 10 [0101] Cada mutación de interés en el fragmento Fc se insertó independientemente en un vector de expresión que contenía la cadena pesada anti-CD20 mediante PCR solapada utilizando dos conjuntos de cebadores adaptados para integrar una delección o un codón degenerado (NNN o NNK) en la posición diana (240 a 243, 258 a 267, 290 a 296, 298 a 305). Los fragmentos así obtenidos por PCR se combinaron y el fragmento resultante se amplificó por PCR utilizando protocolos convencionales. El producto de la PCR se purificó en geles de agarosa al 1 % (p/v), se digirió con las enzimas de restricción apropiadas y se clonó en el vector de expresión eucariota pMGM05-CD20 (pCEP4
- 15 InvitroGen), que contiene sitios de clonación para el fragmento Fc (BamHI y NotI) y la cadena variable VH del anticuerpo anti-CD20. Esta construcción implica la mutación de dos aminoácidos en el Fc (aa224 y 225, HT cambiado a GS) y añade la secuencia EFAAA al C-terminal del Fc, pero permite probar un gran número de clones muy rápidamente. Inicialmente, se comprobó que estas mutaciones no alteraban la unión de la IgG-WT a los distintos

receptores.

[0102] El ADN de los clones aislados se secuenció tras la PCR en colonias. Tras el análisis bioinformático, los clones con nuevas mutaciones se congelaron a -80 °C en bacterias XLI-Blue y las secuencias se incluyeron en nuestra base de datos.

2. Producción de variantes de IgG en células HEK293:

[0103] La cadena ligera anti-CD20 se insertó en un vector pCEP4 idéntico al utilizado para la cadena pesada, designado pMGM01-CDC20 (pCEP4 InvitroGen). Las células HEK293-Freestyle™ (Invitrogen), cultivadas en placas de 24 pocillos, se cotransfectaron con los vectores pMGM01-CD20 y pMGM05-CD20 (Fc-WT y variantes) en cantidades equimolares (250 ng/ml) con reactivo de transfección (1 µl/ml) utilizando protocolos convencionales (Invitrogen). Las células se cultivaron en suspensión en un medio libre de suero durante 7-9 días después de la transfección y se recogieron los sobrenadantes que contenían IgG (1 ml) tras centrifugar las células a 100 g durante 10 minutos. La IgG secretada en los sobrenadantes se cuantificó mediante un ELISA (FastELISA, R&D biotech).

Tabla 1: Lista de mutantes generados

Nombre del mutante	mutaciones
ZAC1-36	V240H
ZAC1-136	V240I
ZAC1-123	V240M
ZAC1-78	V240N
ZAC1-226	V240S
ZAC1-100	F241H
ZAC1-220	F241Y
ZAC1-134	L242A
ZAC1-121	L242F
ZAC1-110	L242G
ZAC1-150	L242H
ZAC1-09	L242I
ZAC1-66	L242K
ZAC1-17	L242P
ZAC1-224	L242S
ZAC1-229	L242T
ZAC1-177	L242V
ZAC1-08	F243L
ZAC1-115	F243S
ZAC2-158	E258G
ZAC2-167	E258I
ZAC2-210	E258R
ZAC2-30	E258M
ZAC2-111	E258Q
ZAC2-86	E258Y

ES 2 965 076 T3

(continuación)

Nombre del mutante	mutaciones
ZAC2-150	V259C
ZAC2-74	V259I
ZAC2-180	V259L
ZAC2-36	T260H
ZAC2-114	T260I
ZAC2-250	T260M
ZAC2-162	T260N
ZAC2-124	T260R
ZAC2-110	T260S
ZAC2-258	T260W
ZAC2-85	T260A
ZAC2-226	V262A
ZAC2-153	V262S
ZAC2-39	V263T
ZAC2-107	V264L
ZAC2-42	V264S
ZAC2-156	V264T
ZAC2-148	V266L
ZAC2-122	V266M
ZAC2-225	S267A
ZAC2-64	S267Q
ZAC2-121	S267V
ZAC3-182	K290D
ZAC3-174	K290E
ZAC3-83	K290G
ZAC3-70	K290H
ZAC3-62	K290L
ZAC3-246	K290N
ZAC3-54	K290Q
ZAC3-41	K290R
ZAC3-203	K290S
ZAC3-172	K290Y
ZAC3-39	P291G
ZAC3-08	P291Q
ZAC3-185	P291R

(continuación)

Nombre del mutante	mutaciones
ZAC3-13	R292I
ZAC3-71	R292L
ZAC3-196	E293A
ZAC3-178	E293D
ZAC3-61	E293G
ZAC3-126	E293M
ZAC3-120	E293Q
ZAC3-10	E293S
ZAC3-15	E293T
ZAC3-118	E294A
ZAC3-53	E294G
ZAC3-82	E294P
ZAC3-80	E294Q
ZAC3-02	E294R
ZAC3-105	E294T
ZAC3-66	E294V
ZAC3-48	Q295I
ZAC3-254	Q295M
ZAC3-110	Y296H
ZAC3-42	Y296W
ZAC4-192	S298A
ZAC4-130	S298R
ZAC4-233	Y300I
ZAC4-14	Y300V
ZAC4-71	Y300W
ZAC4-187	R301A
ZAC4-218	R301M
ZAC4-255	R301P
ZAC4-03	R301S
ZAC4-268	V302A
ZAC4-131	V302F
ZAC4-237	V302L
ZAC4-53	V302M
ZAC4-236	V302R
ZAC4-29	V302S

(continuación)

Nombre del mutante	mutaciones
ZAC4-208	V303S
ZAC4-144	V303Y
ZAC4-219	S304T
ZAC4-33	V305A
ZAC4-229	V305F
ZAC4-262	V305I
ZAC4-139	V305L
ZAC4-36	V305R
ZAC4-179	V305S

Ejemplo 2: Pruebas de unión a los receptores Fc**5 1. Receptores Fc recombinantes utilizados:**

[0104] CD16a es un receptor activador con un polimorfismo V/F en la posición 158 en el sitio de unión a Fc. La afinidad es mejor para CD16aV. CD16aV está disponible comercialmente (R&D system).

10 **[0105]** CD32a es un receptor activador con un polimorfismo H/R en la posición 131 en el sitio de unión a Fc. La afinidad es mejor para CD32aH. CD32aH fue producido por PX'Therapeutics. CD32aR y CD32b están disponibles comercialmente (R&D system).

2. Pruebas ELISA para las variantes de IgG producidas en los sobrenadantes de células HEK293-F:

15

[0106] Se analizó la unión de las variantes de IgG a varios FcR humanos y a FcRn mediante ELISA. Las inmunoplasmas Maxisorp se recubrieron con 0,1 µg de CD32aH/pocillo, o 0,2 µg de CD16aV/pocillo en PBS o 0,25 µg de FcRn en P6 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 6,0). Las placas NiNTA (HisGrab Pierce) se recubrieron con 0,05 µg de CD32aR/pocillo, o 0,2 µg de CD32b/pocillo en PBS. Tras el recubrimiento durante una noche a 4 °C, las placas se lavaron dos veces con PBS (o P6)/Tween-20 al 0,05 % y se saturaron con PBS/BSA al 4 % (o P6, leche desnatada al 4 %) durante 2 horas a 37 °C. Paralelamente, los sobrenadantes se diluyeron en PBS (o P6 para el ensayo FcRn) hasta una concentración final de 0,5 µg de IgG/ml y se mezclaron con F(ab')₂ de IgG HRP de cabra antihumana a la misma concentración durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la IgG añadida a F(ab')₂ se incubó bajo agitación suave durante 1 hora a 30 °C en placas ELISA saturadas sin dilución para CD16aV, CD32aR y CD32b (es decir, IgG a 0,5 µg/ml), se diluyó en PBS a 0,25 µg/ml para CD32aH y se diluyó en P6 a 0,035 µg/ml para FcRn. A continuación, las placas se revelaron con TMB (Pierce) y la absorbancia se leyó a 450 nm.

25 **[0107]** Utilizando este ELISA, las variantes construidas se analizaron en comparación con el Fc de tipo silvestre (Fc-WT) y se calculó su relación variante/Fc-WT, como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Las pruebas ELISA
30 realizadas con estas variantes muestran una relación superior a 2 para al menos uno de los FcγRs probados.

Tabla 2: Pruebas ELISA de unión a los receptores CD16aV, CD32aH, CD32aR y CD32b. Los resultados se expresan como la relación de la variante Fc según la invención/Fc-WT

Nombre de la variante	Mutaciones	Resultados de las pruebas ELISA			
		CD16aV	CD32aH	CD32aR	CD32b
ZAC1-36	V240H	1,91	2,00	0,82	0,78
ZAC1-136	V240I	3,91	3,59	1,71	1,45
ZAC1-123	V240M	4,10	2,16	1,08	1,03
ZAC1-78	V240N	2,44	1,42	0,64	0,89

ES 2 965 076 T3

(continuación)

Nombre de la variante	Mutaciones	Resultados de las pruebas ELISA			
		CD16aV	CD16aV	CD16aV	CD16aV
ZAC 1-226	V240S	3,82	2,51	0,82	0,81
ZAC1-100	F241H	0,77	3,47	1,44	1,44
ZAC 1-220	F241Y	1,60	5,50	1,84	1,10
ZAC1-134	L242A	3,75	3,06	1,75	1,41
ZAC1-121	L242F	5,89	5,31	1,47	1,38
ZAC1-110	L242G	4,40	2,71	1,43	1,35
ZAC1-150	L242H	1,19	2,04	1,14	1,36
ZAC1-09	L242I	5,11	4,99	1,77	1,58
ZAC1-66	L242K	7,27	2,87	3,04	1,32
ZAC1-17	L242P	1,47	2,50	1,19	1,14
ZAC 1-224	L242S	3,34	2,00	0,88	0,91
ZAC 1-229	L242T	1,49	2,11	1,65	1,40
ZAC1-177	L242V	2,49	6,68	1,96	1,70
ZAC1-08	F243L	5,15	2,23	1,60	1,46
ZAC1-115	F243S	2,25	1,48	1,50	1,38
ZAC2-158	E258G	1,16	6,81	1,45	1,29
ZAC2-167	E258I	2,03	6,78	1,83	1,29
ZAC2-30	E258M	1,28	4,52	1,56	1,52
ZAC2-111	E258Q	1,88	8,75	1,55	0,85
ZAC2-210	E258R	1,66	8,17	3,70	2,60
ZAC2-86	E258Y	1,53	5,86	2,30	2,70
ZAC2-150	V259C	1,23	2,91	2,03	1,44
ZAC2-74	V259I	1,06	2,20	1,47	1,10
ZAC2-180	V259L	1,19	3,08	2,14	1,84
ZAC2-85	T260A	4,68	3,89	1,65	1,55
ZAC2-36	T260H	1,16	2,43	1,19	0,91
ZAC2-114	T260I	1,91	7,06	1,46	1,00
ZAC2-250	T260M	1,06	3,80	1,29	1,71
ZAC2-162	T260N	0,94	2,99	1,57	1,27
ZAC2-124	T260R	1,09	3,45	2,60	1,42
ZAC2-110	T260S	1,44	3,71	1,74	0,91
ZAC2-258	T260W	1,49	3,54	1,40	1,24
ZAC2-226	V262A	0,91	5,84	3,78	2,42
ZAC2-153	V262S	1,01	3,64	1,14	1,03

ES 2 965 076 T3

(continuación)

Nombre de la variante	Mutaciones	Resultados de las pruebas ELISA			
		CD16aV	CD16aV	CD16aV	CD16aV
ZAC2-39	V263T	1,13	4,80	1,27	1,01
ZAC2-107	V264L	0,82	2,67	2,13	1,34
ZAC2-42	V264S	0,67	1,40	2,30	2,07
ZAC2-156	V264T	0,91	6,24	1,86	1,42
ZAC2-148	V266L	1,12	2,10	4,67	3,68
ZAC2-122	V266M	0,47	0,34	2,44	2,32
ZAC2-225	S267A	1,26	4,26	5,82	4,75
ZAC2-64	S267Q	0,63	0,43	2,49	3,00
ZAC2-121	S267V	0,59	0,29	2,36	2,02
ZAC3-172	K290Y	4,79	6,72	2,16	1,00
ZAC3-203	K290S	2,28	4,70	1,76	1,21
ZAC3-41	K290R	1,12	1,58	2,15	2,39
ZAC3-54	K290Q	2,47	3,85	1,52	1,50
ZAC3-246	K290N	1,36	3,22	1,71	NA
ZAC3-62	K290L	1,51	2,65	1,35	0,63
ZAC3-70	K290H	3,49	6,48	2,64	1,66
ZAC3-83	K290G	4,20	5,78	1,86	1,83
ZAC3-174	K290E	2,83	4,89	1,66	1,83
ZAC3-182	K290D	2,04	3,38	2,23	NA
ZAC3-185	P291R	0,64	2,57	1,93	NA
ZAC3-08	P291Q	1,61	2,32	0,99	0,96
ZAC3-39	P291G	1,32	2,39	1,28	1,65
ZAC3-71	R292L	1,67	2,22	0,71	0,41
ZAC3-13	R292I	0,81	2,19	0,48	0,53
ZAC3-15	E293T	0,41	1,40	2,07	1,81
ZAC3-10	E293S	1,02	2,95	1,18	1,51
ZAC3-120	E293Q	1,78	2,17	1,49	NA
ZAC3-126	E293M	1,32	2,42	1,81	NA
ZAC3-61	E293G	0,48	1,37	2,44	0,89
ZAC3-178	E293D	0,79	2,68	1,80	NA
ZAC3-196	E293A	0,89	2,99	1,91	NA
ZAC3-66	E294V	1,00	1,91	8,08	0,93
ZAC3-105	E294T	0,80	2,34	1,13	NA
ZAC3-02	E294R	0,71	0,90	2,09	1,58

ES 2 965 076 T3

(continuación)

Nombre de la variante	Mutaciones	Resultados de las pruebas ELISA			
		CD16aV	CD16aV	CD16aV	CD16aV
ZAC3-80	E294Q	0,88	1,26	2,78	1,01
ZAC3-82	E294P	0,87	1,32	2,43	0,70
ZAC3-53	E294G	0,57	3,30	2,34	0,52
ZAC3-118	E294A	1,86	5,10	1,57	1,25
ZAC3-254	Q295M	1,74	2,81	1,10	NA
ZAC3-48	Q295I	0,92	5,36	1,29	0,58
ZAC3-42	Y296W	3,83	1,49	1,20	1,60
ZAC3-110	Y296H	2,17	0,86	0,98	NA
ZAC4-192	S298A	5,53	0,24	0,48	0,51
ZAC4-130	S298R	4,37	0,66	1,09	0,66
ZAC4-233	Y300I	0,69	2,25	1,01	1,04
ZAC4-14	Y300V	0,76	2,37	0,78	2,05
ZAC4-71	Y300W	0,87	2,34	1,14	1,06
ZAC4-187	R301A	0,81	1,25	2,06	2,11
ZAC4-218	R301M	0,95	1,22	1,78	2,07
ZAC4-255	R301P	0,63	4,64	0,06	0,24
ZAC4-03	R301S	1,29	2,42	1,16	1,06
ZAC4-268	V302A	1,00	2,38	1,86	3,09
ZAC4-131	V302F	0,76	2,82	1,06	0,71
ZAC4-237	V302L	0,46	0,31	3,15	4,69
ZAC4-53	V302M	0,63	1,50	2,25	1,56
ZAC4-236	V302R	0,45	0,38	5,08	10,56
ZAC4-29	V302S	1,10	2,51	1,87	1,71
ZAC4-208	V303S	0,96	1,39	1,64	2,27
ZAC4-144	V303Y	1,00	3,50	2,10	1,03
ZAC4-219	S304T	0,98	1,82	2,14	2,34
ZAC4-33	V305A	0,55	1,00	2,20	2,04
ZAC4-229	V305F	1,34	1,11	2,15	2,40
ZAC4-262	V305I	1,22	1,26	1,87	2,22
ZAC4-139	V305L	1,19	2,72	1,87	0,82
ZAC4-36	V305R	1,33	3,50	1,71	2,42
ZAC4-179	V305S	1,29	1,65	2,03	1,66

Ejemplo 3: Pruebas de unión de variantes purificadas de IgG a los receptores Fc

1. Pruebas ELISA para variantes purificadas de IgG:

[0108] Las variantes producidas en los sobrenadantes de células HEK293-F como se describe en el ejemplo 1 se purificaron mediante un proceso convencional de cromatografía de afinidad sobre la proteína A.

5 **[0109]** Las variantes construidas y purificadas se analizaron en comparación con el Fc de tipo silvestre (Fc-WT), según los protocolos que se indican a continuación. Su relación variante/Fc-WT se calculó como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Unión al FcRn humano (hFcRn):

10

[0110] Las inmunoplasmas Maxisorp se recubrieron con FcRn en tampón fosfato a pH6 (250 ng por pocillo) durante una noche a 4 °C (100 µl/pocillo). Tras saturar las placas durante 2 horas en tampón fosfato a pH 6 y leche desnatada al 5 %, se añadieron a cada pocillo soluciones de variantes de IgG a concentraciones crecientes (de 0,00488 a 10 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C y, a continuación, se pusieron en contacto con F(ab')₂ de IgG HRP de cabra anti-Fab humana durante 1 hora a 37 °C. La IgG unida se detectó tras la revelación con TMB midiendo la absorbancia a 450 nm.

15

Unión a CD64 humano (hCD64):

20 **[0111]** Las inmunoplasmas Maxisorp se recubrieron con receptor CD64 humano (100 ng/pocillo) durante la noche a 4 °C (100 µl/pocillo). Tras saturar las placas durante 2 horas en tampón PBS y BSA al 4 %, se añadieron a cada pocillo las soluciones de variantes de IgG a concentraciones crecientes (0,03125 a 1 µl/ml) durante 1 hora a 37 °C y, a continuación, se pusieron en contacto con F(ab')₂ de IgG HRP de cabra anti-CK humana durante 1 hora a 37 °C. La IgG unida se detectó tras la revelación con TMB midiendo la absorbancia a 450 nm.

25

Unión a FcγRs humanos:

[0112] Las inmunoplasmas Maxisorp se recubrieron con 50 ng de hCD32aH/pocillo, 200 ng de hCD16aF/pocillo o 75 ng de hCD16aV/pocillo en PBS. Las placas inmovilizadoras de quelantes de níquel (Hisgrab Pierce) se recubrieron con 50 ng de hCD32aR/pocillo o 100 ng de hCD32b/pocillo en PBS. Tras el recubrimiento durante una noche a 4 °C, las placas se lavaron dos veces con PBS/Tween-20 al 0,05 % y se saturaron con PBS/BSA al 4 % durante 2 horas a 37 °C. Paralelamente, las soluciones de variantes de IgG se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 1 µg de IgG/ml y se mezclaron con F(ab')₂ de IgG HRP de cabra anti-Fab a la misma concentración durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la IgG añadida a F(ab')₂ se incubó bajo agitación suave durante 1 hora a 30 °C en placas ELISA saturadas con diferentes diluciones de PBS. A continuación, las placas se revelaron con TMB y la absorbancia se leyó a 450 nm.

30

35

Tabla 3: Pruebas ELISA de unión a los receptores hCD16aV, hCD16aF, hCD32aH, hCD32aR, hCD32b, hCD64 y hFcRn con variantes purificadas. Los resultados se expresan como la relación de la variante de Fc según la invención/Fc-WT

40

Nombre de la variante	Mutaciones	hCD16aV	hCD16aF	hCD64
		Relación a 0,25 µg/ml	Relación a 0,25 µg/ml	Relación a 0,5 µg/ml
		PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
A3A-184A	K334N/P352S/A378V/V397M	3,53±0,15	2,19±0,36	2,11±0,26
A3A-184E	Y296W/K334N/P352S/A378V/V397M	4,58±0,83	4,27±0,13	1,54±0,18
ZAC3-42	Y296W	2,36±0,07	1,63±0,11	0,91±0,13
ZAC3-83	K290G	1,91±0,10	1,43±0,22	1,18±0,33
ZAC2-210	E258R	1,44±0,97	1,26±0,38	0,97±0,14
ZAC2-226	V262A	0,53±0,10	0,77±0,06	0,80±0,05

Nombre de la variante	Mutaciones	hFcRn Relación a	hCD32aR Relación a	hCD32b Relación a	hCD32aH Relación a
		1,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml
		PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
A3A-184A	K334N/P352S/A378V/V397M	11,31±1,48	1,42±0,14	1,96±0,20	1,73±0,09
A3A-184E	Y296W/K334N/P352S/A378V/V397M	9,45±1,02	1,33±0,04	1,79±0,47	1,73±0,07
ZAC3-42	Y296W	0,90±0,14	1,01±0,04	1,14±0,25	1,01±0,19
ZAC3-83	K290G	0,93±0,14	1,17±0,06	1,31±0,11	1,23±0,03
ZAC2-210	E258R	0,79±0,45	0,53±ND	0,68±ND	1,22±0,45
ZAC2-226	V262A	0,60±0,32	0,48±ND	0,63±ND	0,73±0,00

2. Pruebas de unión en OctetO (tecnología BLI "Bio-Layer Interferometry", Pall):

5

[0113] Se utilizan Biosensores Anti Penta-HIS (HIS 1K). Se inmovilizó el receptor hCD16aV (R&D Systems) diluido a 1 µg/ml en tampón Kinetics, es decir, 44 nM. Las variantes de IgG se probaron a 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15 y 0 nM en tampón Kinetics. Las KD se analizaron utilizando un modelo de asociación 1:1.

10 **[0114]** Los resultados figuran en la tabla 4.

Tabla 4: Pruebas de unión en Octet® con las variantes purificadas

Nombre de la variante	Mutaciones	KD hCD16aV [BLI] (nM)	Relación WT/variante	KD
A3A-184A	K334N/P352S/A378V/V397M	47	12,39	
A3A-184E	Y296W/K334N/P352S/A378V/V397M	80	7,25	
ZAC3-42	Y296W	288	2,02	
ZAC3-83	K290G	326	1,78	
ZAC2-210	E258R	411	1,41	
ZAC1-08	F243L	472	1,23	
ZAC2-85	T260A	472	1,23	
ZAC1-123	V240M	491	1,18	
ZAC1-121	L242F	512	1,13	
ZAC2-226	V262A	518	1,12	
ZAC1-110	L242G	541	1,07	
Fc-WT	SEQ ID NO: 1	580	1,00	

15

Ejemplo 3: Producción de variantes adicionales de IgG en células HEK293

[0115] Las combinaciones de mutantes que comprenden al menos una mutación i) según la invención se han producido a partir de un fragmento Fc que comprende las mutaciones de partida N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y (mutante T5A-74), o V259I/N315D/N434Y (mutante C6A_74) o N315D/N361D/A378V/N434Y (mutante T5A_74A) o K334N/P352S/V397M/A378V (mutante A3A_184A). Se muestran en la Tabla 5.

20

Tabla 5: Variantes adicionales generadas en el contexto de la invención

Nombre	Variante inicial	Mutación i) añadida según la invención	Lista de mutaciones combinadas
T5A-74I	T5A-74	T260A	T260A/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74J	T5A-74	E258I	E258I/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74K	T5A-74	K290Y	K290Y/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74L	T5A-74	E294A	E294A/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
T5A-74M	T5A-74	Y296W	Y296W/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y
C6A_74W	C6A_74	Y296W	Y296W/V259I/N315D/N434Y
C6A_74G	C6A_74	K290G	K290G/V259I/N315D/N434Y
T5A-74MA	T5A_74A	Y296W	Y296W/N315D/N361D/A378V/N434Y
T5A_74AG	T5A_74A	K290G	K290G/N315D/N361D/A378V/N434Y
A3A_184AY	A3A_184A	N434Y	N434Y/K334N/P352S/V397M/A378V
A3A_184E	A3A_184A	Y296W	Y296W/K334N/P352S/V397M/A378V
A3A_184AG	A3A_184A	K290G	K290G/K334N/P352S/V397M/A378V

REIVINDICACIONES

1. Variante de un polipéptido parental que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) y FcγRIIb (CD32b) en comparación con la del polipéptido parental, **caracterizada porque** comprende al menos la mutación Y296W de dicho fragmento Fc; y porque bien:
- 5 (ii) una mutación seleccionada entre 378V, 378T, 434Y y 434S; y
- 10 (iii) al menos una mutación seleccionada entre 226G, P228L, P228R, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S, con la condición de que las mutaciones (ii) y (iii) no se produzcan en los mismos aminoácidos,
- bien:
- 15 (iv) una mutación seleccionada entre 307N, 326E, 326T, 334N, 334R, 352L, 378V, 378T, 394P, 396L, 397M y 421T; y
- (v) al menos una mutación seleccionada entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267N, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 315D, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A, 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378V, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 397M, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N, con la condición de
- 20 que las mutaciones (iv) y (v) no se produzcan en los mismos aminoácidos,
- 25 siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.
2. Variante según la reivindicación 1, que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIa (CD32a) y FcγRIIb (CD32b), en relación con la del polipéptido parental, en una relación de al menos 2, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10, preferentemente superior a 15, preferentemente superior a 20, preferentemente superior a 25, y preferentemente superior a 30.
- 30 3. Variante según la reivindicación 1 o 2, que presenta una mayor afinidad por el receptor FcγRIIIa (CD16a).
- 35 4. Variante según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** comprende como mutación (v) al menos 2 mutaciones seleccionadas entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A, 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S, 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N.
- 40 45 5. Variante según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque:** la mutación (iv) se selecciona entre 378V, 326E, 397M, 307N, 394P, 326T, 396L y 334N, y la mutación (v) se selecciona entre 316D, 334R, 334N, 323I, 231V, 246R, 336T, 378T, 286Y, 286I, 352S, 383R, 359A, 421T, 361H, 315D, 366A, 290E, 307P y 439R, siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat y con la condición de que las mutaciones (iv) y (v) no se produzcan en los mismos aminoácidos.
- 50 6. Variante según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** comprende de 1 a 20 mutaciones de dicho fragmento Fc, preferentemente de 1 a 10 mutaciones.
- 55 7. Variante según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** el polipéptido parental comprende un fragmento Fc parental que es un fragmento Fc humano, preferentemente un fragmento Fc de una IgG1 humana o de una IgG2 humana.
8. Variante según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** se selecciona entre un
- 60 fragmento Fc aislado, una secuencia derivada de un fragmento Fc aislado, un anticuerpo y una proteína de fusión que comprende un fragmento Fc.
9. Variante según la reivindicación 1 a 8, que es un anticuerpo dirigido contra un antígeno seleccionado entre un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, una toxina, una citocina

de membrana o circulante o un receptor de membrana.

10. Variante según una de las reivindicaciones **1 a 9**, para su uso como medicamento.

5 11. Composición farmacéutica que comprende (1) una variante según una de las reivindicaciones **1 a 9**, y (2) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Proceso para producir una variante de un polipéptido que comprende un fragmento Fc, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los
10 receptores FcyRIIIa (CD16a), FcyRIIa (CD32a) y FcyRIIb (CD32b) en comparación con la del polipéptido parental, **caracterizado porque** comprende una etapa de mutación de al menos un aminoácido, siendo Y296W la mutación de dicho fragmento Fc;
dicha variante que comprende bien:

15 (ii) una mutación seleccionada entre 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(iii) al menos una mutación seleccionada entre 226G, P228L, P228R, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S,
con la condición de que las mutaciones (ii) y (iii) no se produzcan en los mismos aminoácidos,

20 bien:

(iv) una mutación seleccionada entre 307N, 326E, 326T, 334N, 334R, 352L, 378V, 378T, 394P, 396L, 397M y 421T; y

25 (v) al menos una mutación seleccionada entre 226Y, 227S, 230S, 231V, 234P, 243I, 243L, 246R, 246E, 247T, 248E, 253F, 254F, 255W, 259A, 261R, 262A, 263A, 266M, 267N, 267G, 274E, 274R, 276S, 278H, 282A, 283G, 284L, 286I, 286Y, 287T, 288E, 288R, 290E, 298N, 302A, 305A, 307P, 308A, 308I, 308G, 309P, 312G, 315D, 316D, 319H, 320T, 320R, 320M, 322E, 323I, 325S, 333G, 334N, 334R, 336T, 339T, 340E, 343S, 345G, 349S, 349H, 350A 352S, 359A, 361H, 362R, 363I, 366A, 373D, 375R, 377T, 378V, 378T, 379A, 380G, 383R, 385R, 389S, 389T, 392R, 393A, 393I, 394P, 396L, 397I, 397M, 398P, 405V, 405L, 410R, 412M, 414R, 421T, 421S, 423L, 423Y, 423S,
30 423P, 428T, 431V, 431T, 434K, 434S, 435R, 436H, 439R, 440G, 440N, 442F, 442P y 447N, con la condición de que las mutaciones (iv) y (v) no se produzcan en los mismos aminoácidos, siendo la numeración la del índice EU o su equivalente en Kabat.

13. Proceso para producir una variante de un polipéptido que comprende un fragmento Fc según la
35 reivindicación **12**, dicha variante que presenta una mayor afinidad por al menos uno de los receptores del fragmento Fc (FcR) seleccionado entre los receptores FcyRIIIa (CD16a), FcyRIIa (CD32a) y FcyRIIb (CD32b), en relación con la del polipéptido parental, en una relación de al menos 2, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10, preferentemente superior a 15, preferentemente superior a 20, preferentemente superior a 25, y preferentemente superior a 30.

40

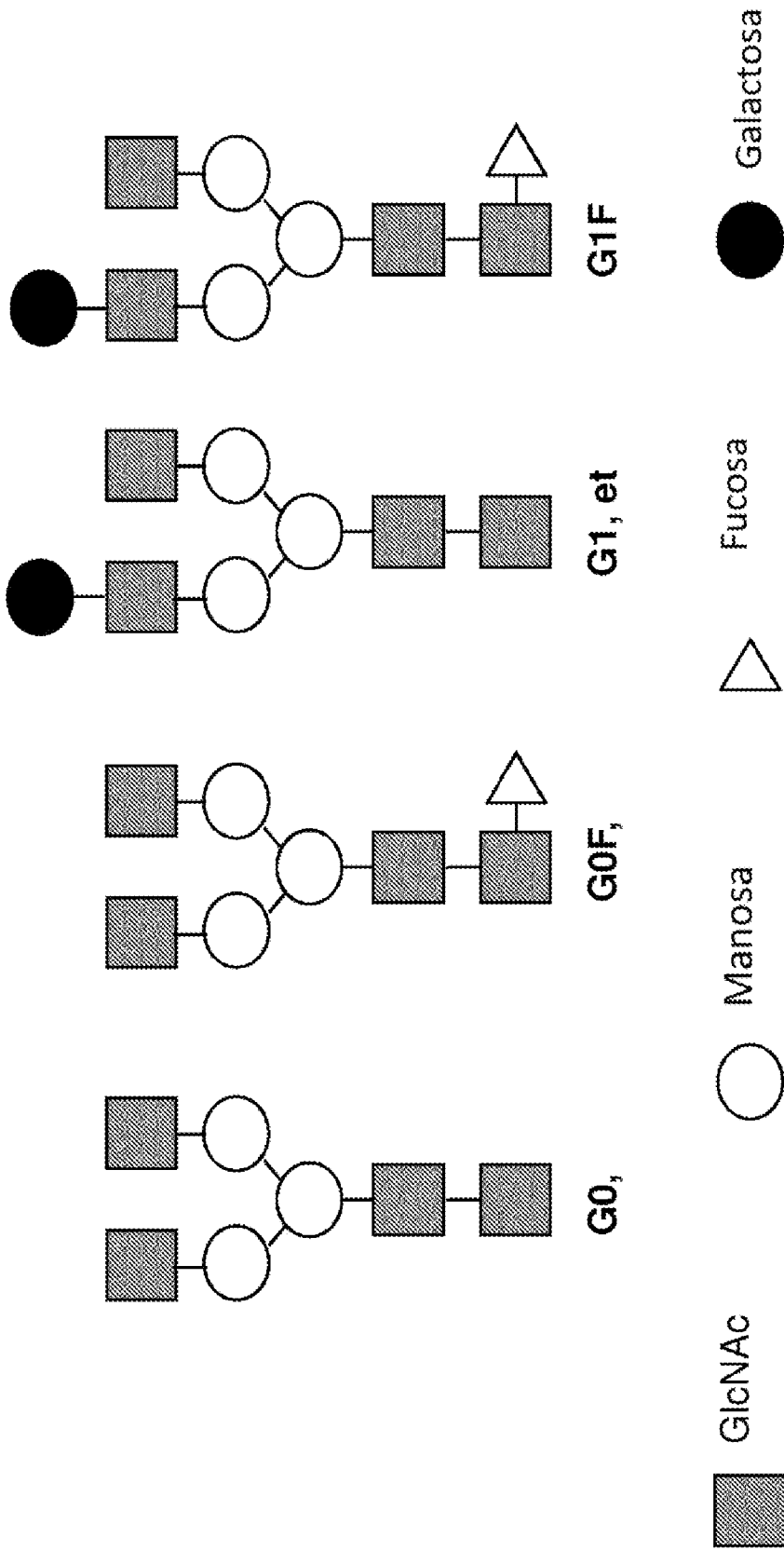


FIG.2