



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0514068-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0514068-4

(22) Data do Depósito: 18/07/2005

(43) Data da Publicação do Pedido: 23/02/2006

(51) Classificação Internacional: C07K 16/00; C12N 15/12; C12N 5/10; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: US 60/598,855 de 04/08/2004; US 60/609,101 de 10/09/2004; US 60/643,718 de 13/01/2005; US 60/602,953 de 19/08/2004; US 60/638,442 de 23/12/2004; US 60/604,339 de 25/08/2004.

(54) Título: ANTICORPO ANTI-CD20, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(73) Titular: APPLIED MOLECULAR EVOLUTION, INC., Sociedade Norte Americana. Endereço: 3520 Dunhill Street San Diego 92121 CA, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: BARRETT ALLAN; WEIDONG JIANG; YING TANG; JEFFRY DEAN WATKINS.

Código de Controle: EE61BB6B085B6369 A57ACB72DEB08D59

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 27/11/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 27/11/2018

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciancio
Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“ANTICORPO ANTI-CD20, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção se refere a polipeptídeos compreendendo uma nova região Fc variante. Especificamente, uma nova região Fc variante da presente invenção compreende pelo menos uma substituição de aminoácido descrita neste lugar que confere uma função efetora alterada ou meia vida no soro alterada em uma imunoglobulina compreendendo a região Fc variante quando comparado à imunoglobulina originária carecendo daquela substituição de aminoácido. Além disso, a invenção fornece um método para alterar uma função efetora de um anticorpo monoclonal ou estender a meia vida no soro de um polipeptídeo ao qual uma região Fc variante da invenção é operavelmente ligada. Usos terapêuticos de polipeptídeos, proteínas, particularmente anticorpos monoclonais, compreendendo uma região Fc variante da invenção são descritos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Existem pelo menos dezessete anticorpos monoclonais atualmente aprovados nos Estados Unidos para uso como terapêuticos humanos. Adicionalmente, existem diversas centenas de anticorpos monoclonais em experimentações clínicas e milhares em teste pré-clínico para tratamento de várias doenças ou desordens incluindo, e.g., rejeição de transplante, câncer, doenças inflamatórias, sepse, nefrite, mal de Alzheimer, alergias, diabetes, doenças auto-imunes, artrite, esclerose múltipla, e doenças infecciosas. O campo de anticorpos monoclonais terapêuticos é localizado para crescimento rápido nos anos seguintes. Depois de vacinas, anticorpos (ou imunoglobulinas, “Ig”) constituem o segundo tipo mais comum de agente biofarmacêutico sendo testado clinicamente (Stockwin, L.H. et al. Biochemical Society Transactions, 31:433-436, 2003).

[0003] Engenharia genética contribuiu substancialmente para crescimento do campo de anticorpos monoclonais terapêuticos. A efetividade de um anticorpo monoclonal terapêutico potencial irá freqüentemente variar com mudanças modestas para a seqüência de proteínas do anticorpo. Uma única mudança de aminoácido na região variável de um anticorpo monoclonal tem o potencial de alterar a afinidade

com a qual o anticorpo se liga ao epítipo antigênico, assim como propriedades de anticorpo tal como taxa de K_{on} ou taxa de K_{off} . Tais mudanças de aminoácido podem determinar o sucesso ou fracasso de um anticorpo monoclonal como um terapêutico. Similarmente, mudanças modestas na seqüência de aminoácidos da região Fc de um anticorpo monoclonal pode produzir profundas mudanças nas propriedades de função efetora de anticorpo ou na meia vida de uma proteína à qual a região Fc é operavelmente ligada.

[0004] A região Fc de um anticorpo (i.e., os términos carboxi-terminais das cadeias pesadas de um anticorpo medindo domínios CH2, CH3 e uma porção da região de dobradiça (veja Fig. 1)), é limitada em variabilidade e é envolvida em efetuar os papéis fisiológicos desempenhados pelo anticorpo. As funções efetoras atribuíveis à região Fc de um anticorpo variam com a classe e subclasse do anticorpo e incluem (i) ligação do anticorpo através da região Fc a um receptor de Fc específico ("FcR") em uma célula que desencadeia várias respostas biológicas incluindo, e.g., fagocitose e destruição de partículas revestidas com anticorpo, depuração de complexos imuno, liberação de mediadores inflamatórios, transferência placentária do anticorpo e controle de produção de imunoglobulina, (ii) citotoxicidade complemento-dependente ("CDC") na qual a região Fc se liga ao componente C1q de complemento e por causa disso inicia a via clássica de ativação de complemento que leva à lise do alvo, (iii) citotoxicidade célula-mediada dependente de anticorpo ("ADCC") na qual certas células do sistema imune humano, e.g., fagócitos e células NK, através de um receptor $Fc\gamma$, se liga à região Fc de um anticorpo através de receptores de ligação de anticorpo específicos nas células imunes e subseqüentemente destruição de sinal da entidade à qual o anticorpo é ligado, e, (iv) ligação a células masto, basófilos, e eosinófilos. A afinidade com a qual uma região Fc pode se ligar a um FcR particular (e.g., $FcRn$), ou o nível com o qual uma região Fc pode mediar atividade de CDC ou ADCC são fatores importantes para determinar a eficácia e meia vida de proteínas terapêuticas, particularmente anticorpos monoclonais.

[0005] Modificações particularizadas de aminoácidos na região Fc de IgG

humana é uma área de estudo ativa produzindo informação de relação estrutura-função relevante para desenvolvimento de proteínas terapêuticas, particularmente anticorpos monoclonais (veja, e.g., Patente Norte-Americana 6.165.745 e Publicação de PCT No. WO2004/035752 considerando alteração de meia vida no soro de um polipeptídeo operavelmente ligado a uma região Fc e Patente Norte-Americana 6.737.056 e Publicação de PCT No. WO2004/029207 considerando alteração de uma função efetora de um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc modificada).

[0006] O desenvolvimento de novas proteínas terapêuticas, particularmente anticorpos monoclonais, iria se beneficiar da habilidade para racionalmente projetar uma região Fc com modificações de aminoácido particulares que conferem uma propriedade benéfica desejada no anticorpo de interesse. Todos os anticorpos monoclonais não seriam esperados para serem melhorados como um terapêutico devido à mesma modificação de aminoácido particular na região Fc. Um anticorpo monoclonal terapêutico que se liga a um antígeno alvo pode se beneficiar de um aumento em uma função efetora particular enquanto um anticorpo monoclonal terapêutico diferente que se liga a um antígeno alvo diferente pode se beneficiar de um aumento em uma função efetora diferente, ou mesmo uma diminuição. Um anticorpo monoclonal terapêutico pode se beneficiar da habilidade de se ligar a um receptor de Fc particular com maior afinidade enquanto outro anticorpo pode ser melhorado como um terapêutico ligando aquele receptor de Fc em uma menor afinidade e portanto sendo limpo do corpo a uma taxa mais rápida. Além disso, uma modificação ou substituição de aminoácido de região Fc particular e efeito resultante que iria beneficiar um anticorpo terapêutico pode depender do alvo antigênico ao qual o anticorpo se liga e/ou da doença ou desordem a ser melhorada pelo anticorpo.

[0007] Métodos e composições que alteram funções efetoras particulares associadas com a região Fc de um anticorpo são necessários para melhorar as propriedades de anticorpos terapêuticos existentes assim como para gerar novos anticorpos terapêuticos com propriedades desejadas. Anticorpos monoclonais com

regiões Fc variantes podem ser usados para tratar várias doenças ou desordens incluindo, e.g., desordens inflamatórias, câncer, desordens auto-imunes, desordens de sinalização celular a doenças infecciosas. Adicionalmente, métodos e composições que alteram a meia vida no soro de uma proteína terapêutica, ou aumentando a meia vida e por isso permitindo menores doses ou diminuindo a meia vida e por isso permitindo depuração mais rápida do corpo, iriam beneficiar a geração de anticorpos terapêuticos assim como outras proteínas terapêuticas.

[0008] O que é necessário a fim de melhorar a eficácia de uma proteína terapêutica, particularmente um anticorpo monoclonal, são regiões Fc variantes com propriedades melhoradas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A presente invenção fornece regiões Fc variantes, i.e., regiões Fc compreendendo uma substituição de aminoácido descrita neste lugar (e.g., veja Tabela 1), que conferem propriedades benéficas em polipeptídeos compreendendo ditas regiões Fc variantes.

[0010] Posições Fc de uma região Fc originário na qual qualquer substituição de aminoácido pode ser feita para gerar uma região Fc variante da invenção incluem posições 279, 341, 343 e 373 da região Fc, em que a numeração dos resíduos, i.e., seus números de posição, na região Fc é aquela do índice EU como em Kabat (veja Fig. 2 neste lugar). A presente invenção fornece regiões Fc variantes compreendendo uma substituição de aminoácido na posição 279, 341, 343 ou 373 de uma região Fc originário, ou qualquer combinação destas. A região Fc originário pode opcionalmente ter resíduos de aminoácidos não nativos em outras posições do que 279, 341, 343 e 373. Os resíduos de aminoácidos nativos nestas posições para IgG humana são valina (279), glicina (341), prolina (343) e tirosina (373).

[0011] Em formas de realização preferidas ao longo da presente invenção, o resíduo de aminoácido substituído por aquele presente na região Fc originário é um resíduo de aminoácido naturalmente ocorrente. A menos que de outra maneira determinado, a região Fc originário pode ser uma região Fc nativa ou não nativa, preferivelmente de origem humana ou substancialmente de origem humana. A

seqüência de aminoácidos da região Fc originário é preferivelmente aquela como mostrado em SEQ ID NOs: 1, 2, 3 ou 4. Preferivelmente a região Fc originário tem um resíduo de aminoácido nativo presente na posição que é para ser substituída para gerar uma região Fc variante da invenção. Além disso, do começo ao fim, é entendido que uma região Fc variante é uma região Fc originário modificada para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como descrito neste lugar. Adicionalmente, é entendido que uma região Fc originário pode ser uma Fc de comprimento completo ou uma porção desta compreendendo o resíduo de aminoácido a ser substituído para gerar a região Fc variante.

[0012] A presente invenção fornece adicionalmente polipeptídeos, preferivelmente anticorpos monoclonais, compreendendo uma região Fc variante (ou um fragmento funcional desta) compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em posição 279, 341, 343 ou 373 quando comparado à região Fc originário. A região Fc variante compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em posição de Fc 279, 341, 343 ou 373 pode compreender adicionalmente pelo menos uma substituição de aminoácido adicional na região Fc quando comparada ao resíduo de aminoácido presente na região Fc nativa do mesmo tipo que a região Fc variante.

[0013] Em uma forma de realização, uma região Fc variante (i.e. uma variante de uma região Fc originário) compreende pelo menos 1, 2, 3 ou mais substituições de aminoácidos selecionadas das seguintes: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F,

288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376K, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V ou 442K.

[0014] Em uma forma de realização preferida, uma região Fc variante compreende pelo menos 1, 2, 3 ou mais substituições de aminoácidos selecionadas das seguintes: 235G, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256W, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283H, 283K, 283M, 283R, 283W, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292G, 292I, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315L, 315P, 316F, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W,

339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373W, 375R, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378D, 378N, 379N, 379Q, 379T, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382I, 382K, 382L, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 440D, 440I ou 440L.

[0015] As regiões Fc variantes da presente invenção são preferivelmente caracterizadas usando um ou mais dos métodos experimentais descritos neste lugar. Tais regiões Fc variantes conferem uma função efetora alterada ou meia vida no soro alterada em um anticorpo monoclonal que compreende a região Fc variante ou uma meia vida no soro alterada em um polipeptídeo ao qual a região Fc variante é operavelmente ligada.

[0016] Preferivelmente a região Fc originário de uma região Fc variante da invenção é uma região Fc nativa ou codificada por linhagem germinativa de origem humana selecionada do grupo consistindo de IgG, IgA, IgE, IgM e IgD ou uma variante polimórfica destas, ou um fragmento funcional destas. Preferivelmente a região Fc originário é uma região Fc de IgG, e mais preferivelmente uma região Fc de IgG1, IgG3, ou IgG4. A região Fc originário pode opcionalmente compreender uma ou mais substituições de aminoácidos adicionais quando comparada à região Fc nativa, outras do que aquelas descritas neste lugar (i.e. aquelas substituições listadas na Tabela 1), particularmente uma ou mais substituições de aminoácidos conhecidas na arte ou como descrito em Patentes Norte-Americanas 6.165.745 ou 6.737.056; ou Publicação de PCT Nos. WO2004/035752 ou WO2004/029207 (todos os quais são incorporados neste lugar em sua totalidade); tais substituições de aminoácidos, se presentes na região Fc originário, iriam então também estar presentes na região Fc variante da invenção e em um polipeptídeo compreendendo

uma região Fc variante da invenção, a menos que elas fossem em uma posição subsequente substituída para gerar a região Fc variante.

[0017] A invenção fornece um polipeptídeo, preferivelmente um anticorpo monoclonal, compreendendo uma região Fc variante da invenção, ou um fragmento funcional desta. Em uma forma de realização preferida, um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção é um anticorpo quimérico. Em uma forma de realização mais preferida, um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção é um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano no qual seqüência de estrutura e seqüência de região constante presentes no anticorpo são substancialmente de origem humana. O anticorpo quimérico, humanizado ou humano é preferivelmente um anticorpo de comprimento completo ou um anticorpo de cadeia única. Quando um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção é para ser usado como um terapêutico humano, a região Fc é preferivelmente substancialmente de origem humana.

[0018] Preferivelmente um polipeptídeo compreendendo, ou operavelmente ligado a, uma região Fc variante da invenção (i.e., "polipeptídeo variante") tem pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc variante quando comparado à região Fc originário, e manifesta uma função efetora alterada ou meia vida no soro alterada quando comparado àquela do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário de dita região Fc variante, caracterizado pelo fato de que "pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc variante" é (i) qualquer substituição de aminoácido na posição 279, 341, 343 ou 373 da região Fc ou (ii) pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H,

279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V ou 442K, ou (iii) pelo menos duas substituições de aminoácidos como listado em (i) ou (ii) acima, ou (iv) pelo menos 1, 2 ou 3 substituições de aminoácidos como listado em (i) ou (ii) acima em adição à pelo menos uma substituição de aminoácido de região Fc não listada em (i) ou (ii) acima. Preferivelmente a função efetora alterada é um aumento em ADCC, uma diminuição em ADCC, um aumento em CDC, uma diminuição em CDC, um aumento em afinidade de ligação de C1q, uma diminuição em afinidade de ligação de C1q, um aumento em afinidade de ligação de FcR (preferivelmente FcRn), uma diminuição em afinidade de ligação de FcR (preferivelmente FcRn) quando comparado a dito polipeptídeo carecendo da substituição de aminoácido na região Fc (i.e., região Fc originário).

[0019] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de

aminoácidos na região Fc: 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 254F, 254M, 254Y, 256A, 258D, 279A, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I ou 440L, [preferivelmente 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I ou 440L], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta ADCC realçada quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0020] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 317T, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V ou 442K, [preferivelmente 235R, 236F, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I,

267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272N, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332K, 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376A, 376W, 432R ou 432S], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta ADCC diminuída quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0021] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K ou 442K, [preferivelmente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L ou 438W], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta afinidade de ligação de FcRn realçada quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0022] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F ou 440M, [preferivelmente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P ou 432S], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta afinidade de ligação de FcRn diminuída quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0023] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S,

279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332L, 332M, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q ou 440Y, [preferivelmente 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376H, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 434Y, 438L ou 440Y], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta atividade de CDC realçada quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0024] A invenção fornece um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de

aminoácidos na região Fc: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332E, 332M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M ou 427N [preferivelmente 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 378D, 385E, 423N ou 424H], caracterizada pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante manifesta atividade de CDC diminuída quando comparado ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário.

[0025] A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção, caracterizado pelo fato de que dito anticorpo especificamente se liga a um antígeno alvo humano. Preferivelmente o antígeno alvo é selecionado do grupo consistindo de CD3, CD20, CD25, TNF α , Her2/neu, CD33, Cd52, EGFR, EpCAM, MUC1, GD3, CEA, CA125, HLA-DR, TGF β , VEGF, GDF8, GDF11, grelina, ou qualquer precursor ou fragmento funcional destes.

[0026] A invenção fornece um polipeptídeo variante compreendendo uma região Fc variante da invenção compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N,

380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K ou 442K, [preferivelmente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L ou 438W], caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo variante manifesta meia vida no soro realçada quando comparado ao polipeptídeo originário (i.e., um polipeptídeo idêntico ao polipeptídeo variante mas carecendo da substituição de aminoácido listada neste lugar acima).

[0027] A invenção fornece um polipeptídeo variante compreendendo uma região Fc variante da invenção compreendendo pelo menos uma das seguintes substituições de aminoácidos na região Fc: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F ou 440M, [preferivelmente 237R, 247D, 247E, 247F,

247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P ou 432S], caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo variante manifesta meia vida no soro diminuída quando comparado ao polipeptídeo originário (i.e., um polipeptídeo idêntico ao polipeptídeo variante mas carecendo da substituição de aminoácido listada neste lugar acima).

[0028] Em uma forma de realização a invenção fornece um método para aumentar a atividade de ADCC de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico (ou fragmento funcional deste), compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 247A, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 251F, 254F, 254M, 254Y, 256A, 256M, 258D, 268D, 268E, 279A, 280A, 280K, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 330K, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I ou 440L, [preferivelmente 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I ou 440L]. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o

método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante (i.e., depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima) a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir atividade de ADCC do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com atividade de ADCC maior do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário (i.e., realçada, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal, ou fragmento funcional deste, compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0029] Em uma forma de realização a invenção fornece um método para diminuir a atividade de ADCC de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico (ou fragmento funcional deste), compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283T, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F,

341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 429A, 429F, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V ou 442K, [preferivelmente 235R, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 249P, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 329Y, 332K, 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376W, 429A, 432R ou 432S]. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante (i.e., depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima) a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir atividade de ADCC do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com atividade de ADCC menor do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a

região Fc originário (i.e., diminuída, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal, ou fragmento funcional deste, compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0030] Em uma forma de realização a invenção fornece um método para aumentar a afinidade de ligação de FcRn de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico (ou fragmento funcional deste), compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K ou 442K, [preferivelmente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L ou 438W]. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região

Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o método pode adicionalmente compreender subsequente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante (i.e., depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima) a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir afinidade de ligação de FcRn do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com afinidade de ligação de FcRn maior do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário (i.e., realçada, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal, ou fragmento funcional deste, compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0031] Em uma forma de realização a invenção fornece um método para aumentar a meia vida no soro in vivo de um polipeptídeo, preferivelmente um polipeptídeo terapêutico, compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N,

318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K ou 442K, [preferivelmente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L ou 438W]. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser operavelmente ligada a uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína terapêutica. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando polipeptídeo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando a região não Fc da proteína de fusão), ou o método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima a ácido nucleico codificando um parceiro de fusão não Fc. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do polipeptídeo compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir meia vida no soro in vivo do polipeptídeo compreendendo a região Fc variante e do polipeptídeo compreendendo

a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo tem meia vida no soro in vivo aumentada quando comparado àquela do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário (i.e., realçada, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um polipeptídeo (i.e., um polipeptídeo de fusão) compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0032] Em uma forma de realização a invenção fornece um método para diminuir a afinidade de ligação de FcRn de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico (ou fragmento funcional deste), compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F ou 440M, [preferivelmente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D,

341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P ou 432S]. A molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir afinidade de ligação de FcRn do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com afinidade de ligação de FcRn menor do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário (i.e., diminuída, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal (compreendendo uma região Fc variante) produzido pelo método.

[0033] Em outra forma de realização a invenção fornece um método para diminuir a meia vida no soro in vivo de um polipeptídeo, preferivelmente um polipeptídeo terapêutico, compreendendo engenheirar um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico codificando uma região Fc variante compreendendo pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F,

247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F ou 440M, [preferivelmente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P ou 432S]. O ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser operavelmente ligado a ácido nucleico codificando uma proteína terapêutica. A molécula de ácido nucleico codificando a região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando polipeptídeo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando a região não Fc da proteína de fusão), ou o método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima a ácido nucleico codificando um parceiro de fusão não Fc. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do polipeptídeo compreendendo a região Fc variante. O

método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir meia vida no soro in vivo do polipeptídeo compreendendo a região Fc variante e do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo tem meia vida no soro in vivo diminuída quando comparado àquela do polipeptídeo compreendendo a região Fc originário (i.e., diminuída, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um polipeptídeo (i.e., um polipeptídeo de fusão) compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0034] Em outra forma de realização a invenção fornece um método para aumentar a atividade de CDC de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico, compreendendo construir a região Fc do anticorpo para compreender pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 250K, 250R, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332H, 332L, 332M, 332N, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R,

376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q ou 440Y, [preferivelmente 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 250K, 250R, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 434Y, 438L ou 440Y]. A molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o método pode adicionalmente compreender subseqüentemente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante depois de introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir atividade de CDC do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo

monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com atividade de CDC maior do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário (i.e., realçada, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0035] Em outra forma de realização a invenção fornece um método para diminuir a resposta de CDC de um anticorpo monoclonal, preferivelmente um anticorpo monoclonal terapêutico, compreendendo construir a região Fc do anticorpo para compreender pelo menos umas das seguintes substituições de aminoácidos: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332K, 339K, 339M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M ou 427N [preferivelmente 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 330R, 378D, 385E, 423N ou 424H]. A molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc variante pode ser engenheirada (e.g. a partir de uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc originário ou uma região Fc nativa) para compreender pelo menos uma substituição de aminoácido como listado acima ou enquanto a molécula de ácido nucleico é operavelmente ligada a ácido nucleico adicional codificando anticorpo, (e.g. a seqüência de ácidos nucleicos codificando o restante da cadeia pesada de Ig), ou o método pode adicionalmente compreender subsequente operavelmente ligar o ácido nucleico codificando a região Fc variante depois de

introdução de pelo menos uma substituição de aminoácido listada acima a ácido nucleico adicional codificando anticorpo. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante. O método pode adicionalmente compreender expressão e purificação do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário. O método pode adicionalmente compreender medir atividade de CDC do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante e do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário por qualquer método disponível na arte ou como descrito neste lugar. O método pode adicionalmente compreender selecionar um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante com atividade de CDC menor do que aquela do anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário (i.e., diminuída, preferivelmente em pelo menos 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20% ou mais). A invenção incorpora adicionalmente um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante produzido pelo método.

[0036] Em outra forma de realização, a invenção fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma região Fc variante da invenção ou um fragmento funcional desta. Mais preferivelmente a molécula de ácido nucleico isolada compreende um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção. Preferivelmente o polipeptídeo de região Fc variante codificado por dito ácido nucleico tem uma substituição de aminoácido como mostrado em Tabela 1 quando comparado à região Fc originário da variante. Preferivelmente, o polipeptídeo é um anticorpo monoclonal, e ainda mais preferivelmente, o anticorpo monoclonal é um anticorpo de comprimento completo ou um anticorpo de cadeia simples. O anticorpo monoclonal pode ser quimérico, humanizado ou anticorpo monoclonal humano.

[0037] Em outra forma de realização, a invenção fornece um vetor, preferivelmente (mas não limitado a) um plasmídeo, um vetor de expressão recombinante, um vetor de expressão de levedura, ou um vetor de expressão retroviral compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo de região Fc variante da invenção.

[0038] Em outra forma de realização, a invenção fornece uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. Preferivelmente uma célula hospedeira da invenção compreende um ou mais vetores ou construtos compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. A célula hospedeira da invenção é uma célula na qual um vetor da invenção foi introduzido (e.g., através de transformação, transdução, infecção, transfecção, eletroporação e os semelhantes), dito vetor compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo de região Fc variante da invenção. Opcionalmente, o vetor pode ser estavelmente incorporado no cromossomo da célula hospedeira. Os tipos de célula hospedeira incluem células de mamíferos, bacterianas, vegetais e de levedura. Preferivelmente a célula hospedeira é uma célula CHO, uma célula COS, uma célula SP2/0, uma célula NOS, uma célula de levedura ou uma derivada ou progenia de qualquer tipo de célula preferido.

[0039] Em outra forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção, ou um fragmento funcional deste. Preferivelmente o polipeptídeo é um anticorpo monoclonal, ainda mais preferivelmente, um anticorpo monoclonal terapêutico. O anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo monoclonal quimérico, humanizado, ou humano. Alternativamente, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo outro do que um anticorpo que se beneficia de uma meia vida no soro alterada conferida no polipeptídeo sendo operavelmente ligado a, e co-expresso com, uma região Fc variante da invenção. A composição farmacêutica da invenção pode adicionalmente compreender um portador farmacêuticamente aceitável. Em dita composição farmacêutica, o polipeptídeo compreendendo a região Fc variante é o ingrediente ativo. Preferivelmente a composição farmacêutica compreende uma população homogênea ou substancialmente homogênea de anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção. A composição farmacêutica para uso terapêutico é preferivelmente estéril e pode ser liofilizada.

[0040] A invenção fornece um método de inibir atividade de uma proteína em um

mamífero, preferivelmente um humano, com necessidade desta compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente efetiva, ou quantidade profilaticamente efetiva de um polipeptídeo (preferivelmente um anticorpo monoclonal) compreendendo uma região Fc variante da invenção para dito mamífero. Preferivelmente, o polipeptídeo compreendendo a região Fc variante é um parceiro de ligação da proteína a ser inibida. A invenção fornece adicionalmente um método de tratar ou prevenir uma doença ou desordem melhorada pela inibição de transdução sinal resultando da ligação de um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da invenção ao seu epítipo antigênico que compreende administrar a um paciente (e.g., um humano) com necessidade de tal tratamento ou prevenção uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente efetiva de um anticorpo monoclonal da invenção.

[0041] A invenção incorpora um artigo de fabricação compreendendo um material de embalagem e um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo de região Fc variante da invenção contido dentro de dito material de embalagem. A invenção incorpora adicionalmente composições compreendendo anticorpos monoclonais e polipeptídeos heterólogos que compreendem uma região Fc variante descritos neste lugar e um portador ou diluente fisiologicamente ou farmacologicamente aceitável.

[0042] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece um polipeptídeo compreendendo: i) uma região de estrutura ("FR") humana não modificada (e.g. nenhuma alteração foi feita em uma estrutura humana naturalmente ocorrente), e ii) uma região Fc variante. Em certas formas de realização a estrutura humana não modificada é uma estrutura humana de linhagem germinativa. Em outras formas de realização, a presente invenção fornece composições compreendendo um polipeptídeo, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo compreende: i) pelo menos uma seqüência CDR aleatorizada e ii) uma região Fc variante da invenção. Em formas de realização adicionais, a presente invenção fornece composições compreendendo um polipeptídeo, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo compreende: i) uma estrutura humana não modificada (e.g.,

estrutura humana de linhagem germinativa), ii) pelo menos uma seqüência CDR aleatorizada, e iii) uma região Fc variante da invenção.

[0043] A presente invenção contempla usos terapêuticos e diagnósticos para polipeptídeos heterólogos de anticorpos monoclonais que compreendem uma região Fc variante da invenção, descritos neste lugar.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0044] Figura 1 mostra uma representação esquemática de uma molécula de IgG com as várias regiões e seções marcadas.

[0045] Figura 2 mostra um alinhamento de várias seqüências de aminoácidos de Fc originárias, incluindo IgG1 humana ((SEQ ID NO: 1) com alótipos não a e a mostrados), IgG2 humana (SEQ ID NO: 2), IgG3 humana (SEQ ID NO: 3), IgG4 humana (SEQ ID NO: 4), IgG1 murina (SEQ ID NO: 5), IgG2A murina (SEQ ID NO: 6), IgG2B murina (SEQ ID NO: 7) e IgG3 murina (SEQ ID NO: 8).

[0046] Figura 3 mostra várias seqüências de aminoácidos, incluindo a região CH2 (SEQ ID NO: 9), e região CH3 (SEQ ID NO: 10) de IgG1 humana, assim como uma seqüência de IgG1 humana alótipo f (SEQ ID NO: 11) e uma, alótipo z (SEQ ID NO: 12) que incluem as regiões CH1, dobradiça, CH2 e CH3.

[0047] Figura 4 mostra várias seqüências de aminoácidos compreendidas dentro de: (a) a Região Variável de Cadeia Leve (LCVR) de anticorpo anti-CD20 (I) (SEQ ID NO: 13); (b) a Região Variável de Cadeia Pesada (HCVR) de anticorpo anti-CD20 (I) (SEQ ID NO: 14); (c) LCVR de anticorpo anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 15); e (d) HCVR de anticorpo anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 16). Fig. 4e mostra seqüências de aminoácidos compreendidas dentro da região variável de um anticorpo anti-CD20. (veja pedido provisório de Patente Norte-Americana 60/471.958, depositado em 20 de Maio de 2003 e Patente Norte-Americana 5.843.439, ambos incorporados neste lugar).

[0048] Figura 5a mostra a seqüência de aminoácidos de cadeia leve completa para o anticorpo anti-CD20 AME 133. Figura 5b mostra a seqüência de ácidos nucleicos de cadeia leve completa para AME 133.

[0049] Figura 6 mostra seqüências de aminoácidos e ácidos nucleicos para a

cadeia pesada completa de três variantes preferidas do anticorpo anti-CD20 AME 133. Especificamente, Figura 6a mostra a seqüência de aminoácidos da cadeia pesada completa da variante 247I/339Q. Figura 6b mostra a seqüência de ácidos nucleicos da cadeia pesada completa da variante 247I/339Q. Figura 6c mostra a seqüência de aminoácidos da cadeia pesada completa da variante 247I/339D. Figura 6d mostra a seqüência de ácidos nucleicos da cadeia pesada completa da variante 247I/339D. Figura 6e mostra a seqüência de aminoácidos da cadeia pesada completa da variante 378D. Figura 6f mostra a seqüência de ácidos nucleicos da cadeia pesada completa da variante 378D.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0050] Do começo ao fim do presente relatório e reivindicações, a numeração dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia pesada de imunoglobulina (região Fc) é aquela do índice EU como em Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). O “índice EU como em Kabat” se refere à numeração de resíduo do anticorpo de IgG humana e é refletido neste lugar na Fig. 2. Por exemplo, na posição 438, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas e IgG3 murina todas têm um aminoácido Q, enquanto IgG1 murina tem um aminoácido I, IgG2a murina tem um aminoácido T, e IgG2B murina tem um aminoácido K. Além disso, substituições são denominadas neste lugar pelo número de posição de aminoácido na qual a substituição ocorre seguida pelo aminoácido substituído por aquele presente na região Fc originário na mesma posição (e.g., 249G indica um resíduo de glicina substituído por aquele presente na posição 249 da região Fc originário). O número se refere à posição em IgG1 humana indiferente se a região Fc originário é ou não IgG1 humana; se a região Fc originário não é IgG1 humana, o número se refere à posição homóloga na região Fc originário se esta fosse alinhada com IgG1 humana nesta posição.

[0051] Como usado neste lugar, os termos “sujeito” e “paciente” se referem a qualquer animal no qual um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção pode ser usado terapeuticamente, incluindo um humano assim como

outros mamíferos (tal como e.g., animais domésticos (e.g., canino, felino), animais de esporte (e.g., eqüino) e animais fonte de alimento (e.g., bovino, suíno e ovino)) que podem se beneficiar de tal terapia.

[0052] Como usado neste lugar, “tratar ou prevenir” se refere a uma doença ou desordem associada com níveis anormais de uma proteína ou beneficiada alterando uma atividade ou nível de uma proteína.

[0053] O termo “isolado” quando usado em relação a um ácido nucleico é um ácido nucleico que é identificado e separado de pelo menos um ácido nucleico contaminante com o qual ele é habitualmente associado em sua fonte natural. Ácido nucleico isolado é de alguma forma ou ajuste diferente daquele no qual é encontrado na natureza. Moléculas de ácidos nucleicos isoladas portanto são distinguidas da molécula de ácido nucleico como elas existem em células naturais. Uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que habitualmente expressam o polipeptídeo codificado nessa onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está em um plasmídeo ou localização cromossômica diferente daquela de células naturais. A molécula de ácido nucleico isolada pode estar presente em forma de fita simples ou fita dupla. Quando uma molécula de ácido nucleico isolada é para ser utilizada para expressar uma proteína, o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo irá conter no mínimo a fita sentido ou de codificação, mas pode conter ambas as fitas sentido e anti-sentido (i.e., pode ser de dupla fita).

[0054] Uma molécula de ácido nucleico é “operavelmente ligada” ou “operavelmente unida” quando ela é colocada em uma relação funcional com outra molécula de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou reforçador é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação de ácido nucleico se ele afeta a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossomo é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação de ácido nucleico se ele é posicionado de forma a facilitar tradução. Uma molécula de ácido nucleico codificando uma região Fc variante é operavelmente ligada a uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína heteróloga (i.e., uma proteína ou fragmento funcional desta que não,

como ela existe na natureza, compreende uma região Fc) se ela é posicionada de forma que a proteína de fusão expressa compreende a proteína heteróloga ou fragmento funcional desta unida ou acima ou abaixo do polipeptídeo de região Fc variante; a proteína heteróloga pode ser imediatamente adjacente ao polipeptídeo de região Fc variante ou pode ser separada deste por uma seqüência conectora de qualquer comprimento e composição. Da mesma maneira, uma molécula de polipeptídeo (usado sinonimamente neste lugar com “proteína”) é “operavelmente ligada” ou “operavelmente unida” quando ela é colocada em uma relação funcional com outro polipeptídeo.

[0055] Como usado neste lugar o termo “fragmento funcional” quando em referência a um polipeptídeo ou proteína (e.g., uma região Fc variante, ou um anticorpo monoclonal) se refere a fragmentos daquela proteína que retêm pelo menos uma função do polipeptídeo de comprimento completo. Os fragmentos podem variar em tamanho de seis aminoácidos até a seqüência de aminoácidos inteira do polipeptídeo de comprimento completo menos um aminoácido. Um fragmento funcional de um polipeptídeo de região Fc variante da presente invenção retém pelo menos uma “substituição de aminoácido” como neste lugar definido. Um fragmento funcional de um polipeptídeo de região Fc variante retém pelo menos uma função conhecida na arte por ser associada com a região Fc (e.g., ADCC, CDC, ligação de receptor de Fc, ligação de C1q, regulação para baixo de receptores de superfície celular ou pode, e.g., aumentar a meia vida in vivo ou in vitro de um polipeptídeo ao qual ele é operavelmente ligado).

[0056] O termo “purificado” ou “purificar” se refere à remoção substancial de pelo menos um contaminante de uma amostra. Por exemplo, um anticorpo antígeno-específico pode ser purificado por remoção completa ou substancial (pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, ou mais preferivelmente pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99%) de pelo menos uma proteína não imunoglobulina contaminante; ele também pode ser purificado pela remoção de proteína imunoglobulina que não se liga ao mesmo antígeno. A remoção de proteínas não imunoglobulina e/ou a remoção de imunoglobulinas que não se ligam ao antígeno particular resulta em um

aumento no percentual de imunoglobulinas antígeno-específicas na amostra. Em outro exemplo, um polipeptídeo (e.g., uma imunoglobulina) expresso em células hospedeiras bacterianas é purificado pela remoção completa ou substancial de proteínas de célula hospedeira; o percentual do polipeptídeo é por causa disso aumentado na amostra.

[0057] O termo “nativo” ao se referir a um polipeptídeo (e.g., região Fc) é usado neste lugar para indicar que o polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácidos consistindo da seqüência de aminoácidos do polipeptídeo como comumente ocorre na natureza ou um polimorfismo naturalmente ocorrente deste. Um polipeptídeo nativo (e.g., região Fc nativa) pode ser produzido por meio recombinante ou pode ser isolado de uma fonte naturalmente ocorrente.

[0058] O termo “vetor de expressão” como usado neste lugar se refere a uma molécula de DNA recombinante contendo uma seqüência de codificação desejada e seqüências de ácidos nucleicos apropriadas necessárias para a expressão da seqüência de codificação operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular.

[0059] Como usado neste lugar, o termo “célula hospedeira” se refere a qualquer célula eucariótica ou procariótica (e.g., células bacterianas tal como E. coli, células CHO, células de levedura, células de mamífero, células de ave, células de anfíbio, células vegetais, células de peixe, e células de inseto), quer localizada in vitro ou in situ, ou in vivo. Por exemplo, células hospedeiras podem ser localizadas em um animal transgênico.

[0060] Como usado neste lugar um “polipeptídeo originário” é um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos que pode ser trocada ou alterada (e.g., uma substituição de aminoácido) para produzir uma variante (i.e., polipeptídeo variante). Em formas de realização preferidas, o polipeptídeo originário compreende pelo menos uma porção de uma região Fc nativa ou não nativa, i.e., uma região Fc naturalmente ocorrente ou uma região Fc com pelo menos uma modificação de seqüência de aminoácidos. Em algumas formas de realização, variantes que são mais curtas ou mais compridas do que o polipeptídeo originário são especificamente

contempladas. Em formas de realização particularmente preferidas, o polipeptídeo originário difere em função (e.g., realçada ou diminuída função efetora, ligação de receptor, meia vida in vivo ou in vitro, etc.) quando comparado à variante.

[0061] Como usado neste lugar, o termo “variante de um polipeptídeo originário” se refere a um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos que difere daquela do polipeptídeo originário por pelo menos uma substituição de aminoácido. Em certas formas de realização, a variante compreende pelo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% ou 90% ou mais preferivelmente pelo menos 95%, 97% ou 99% de uma região Fc (i.e., uma “porção” da região Fc). Em formas de realização preferidas, a região Fc variante de um polipeptídeo originário compreende pelo menos uma substituição de aminoácido do polipeptídeo originário, a substituição sendo na região Fc. O polipeptídeo originário pode ser ou não ser um polipeptídeo nativo.

[0062] Como usado neste lugar, o termo “região Fc” se refere a uma região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina (e.g., como mostrado na Fig. 1). A “região Fc” pode ser uma região Fc de seqüência nativa ou uma região Fc variante. Embora os limites geralmente aceitos da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é normalmente definida para esticar a partir de um resíduo de aminoácido na posição Cis226, ou a partir de Pro230, para o término carboxílico desta. A região Fc de uma imunoglobulina geralmente compreende dois domínios constantes, CH2 e CH3, como mostrado, e.g., na Fig. 1. Em algumas formas de realização, variantes tendo um ou mais dos domínios constantes são contempladas. Em outras formas de realização, variantes sem tais domínios constantes (ou apenas com porções de tais domínios constantes) são contempladas.

[0063] O “domínio CH2” de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “C γ 2”) normalmente se estende a partir de cerca de aminoácido 231 a cerca de aminoácido 340 (veja Fig. 2). O domínio CH2 é único por não ser proximamente pareado com outro domínio. Duas cadeias ramificadas de carboidrato N-conectadas são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG

nativa intacta.

[0064] O “domínio CH3” de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “Cγ3”) geralmente é o esticamento de resíduos C-terminais para um domínio CH2 em uma região Fc se estendendo de cerca de aminoácido 341 a cerca de aminoácido 447 (veja Fig. 2).

[0065] Uma “região Fc funcional” possui uma “função efetora” de uma região Fc de seqüência nativa. Pelo menos uma função efetora de um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da presente invenção pode ser realçada ou diminuída com respeito a um polipeptídeo compreendendo uma região Fc nativa ou a região Fc originário da variante. Exemplos de funções efetoras incluem, mas não são limitados a: ligação de Clq; citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação de receptor de Fc; citotoxicidade célula-mediada dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; regulação para baixo de receptores de superfície celular (e.g., receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetoras podem requerer que a região Fc seja operavelmente ligada a um domínio de ligação (e.g., um domínio variável de anticorpo) e podem ser verificadas usando vários ensaios (e.g., ensaio de ligação de Fc, ensaios de ADCC, ensaios de CDC, depleção de célula alvo de amostras de sangue inteiras ou fracionadas, etc.).

[0066] Uma “região Fc de seqüência nativa” ou “região Fc tipo selvagem” se refere a uma seqüência de aminoácidos que é idêntica à seqüência de aminoácidos de uma região Fc comumente encontrada na natureza. Regiões Fc humanas de seqüência nativa exemplares são mostradas na Figura 2 e incluem uma região Fc de IgG1 humana de seqüência nativa (alótípos f e a,z, i.e., alótípos não A e A); região Fc de IgG2 humana de seqüência nativa; região Fc de IgG3 humana de seqüência nativa; e região Fc de IgG4 humana de seqüência nativa assim como variantes naturalmente ocorrentes destas. Regiões Fc murinas de seqüência nativa também são mostradas na Figura 2.

[0067] Uma “região Fc variante” compreende uma seqüência de aminoácidos que difere daquela de uma região Fc de seqüência nativa (ou fragmento desta) por virtude de pelo menos uma “substituição de aminoácido” como definido neste lugar.

Em formas de realização preferidas, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido comparada com uma região Fc de seqüência nativa ou na região Fc de um polipeptídeo originário, preferivelmente 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácidos na região Fc de seqüência nativa ou na região Fc de um polipeptídeo originário. Em uma forma de realização alternativa, uma região Fc variante pode ser gerada de acordo com os métodos neste lugar descritos e esta região Fc variante pode ser fusionada a um polipeptídeo heterólogo de escolha, tal como um domínio variável de anticorpo ou um polipeptídeo não anticorpo, e.g., ligando domínio de um receptor ou ligante.

[0068] Como usado neste lugar, o termo “derivado” no contexto de polipeptídeos se refere a um polipeptídeo que compreende uma seqüência de aminoácidos que foi alterada por introdução de uma substituição de resíduo de aminoácido. O termo “derivado” como usado neste lugar também se refere a um polipeptídeo que foi modificado pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao polipeptídeo. Por exemplo, mas não de maneira a limitar, um anticorpo pode ser modificado, e.g., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Um polipeptídeo derivado pode ser produzido por modificação química usando técnicas conhecidas por aqueles de verso na arte, incluindo, mas não limitadas à clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Ademais, um polipeptídeo derivado possui uma função similar ou idêntica que o polipeptídeo do qual ele é derivado. É entendido que um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da presente invenção pode ser um derivado como definido neste lugar, preferivelmente a derivação ocorre dentro da região Fc.

[0069] “Substancialmente de origem humana” como usado neste lugar em referência a um polipeptídeo (e.g., uma região Fc ou um anticorpo monoclonal), indica que polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80%, pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, ou ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homóloga àquela de

um polipeptídeo amino humano nativo.

[0070] Os termos “receptor de Fc” ou “FcR” são usados para escrever um receptor que se liga a uma região Fc (e.g., a região Fc de um anticorpo). O FcR preferido é um FcR de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo de IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII, FcγRIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas processadas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um “receptor ativador”) e FcγRIIB (um “receptor inibidor”), que têm seqüências de aminoácidos similares que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos destas. FcRs são revistos em Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel, et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Outros FcR preferidos incluem o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são abrangidos pelo termo “FcR” neste lugar.

[0071] A frase “citotoxicidade célula-mediada dependente de anticorpo” e “ADCC” se refere a uma reação célula-mediada na qual células citotóxicas não específicas (e.g., não específicas) que expressam FcRs (e.g., células exterminadoras naturais (“NK”), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequente causam a lise das células alvo. As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, ao passo que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII.

[0072] Como usado neste lugar, a frase “células efetoras” se refere a leucócitos (preferivelmente humanos) que expressam um ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora ADCC. Exemplos de leucócitos que mediam ADCC incluem PBMC, células NK, monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos. As células efetoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa (e.g. de sangue ou PBMCs).

[0073] Um polipeptídeo variante com afinidade de ligação de FcRn “alterada” é um que tem afinidade de ligação de FcRn ou realçada (i.e., aumentada, maior ou

superior) ou diminuída (i.e., reduzida, decrescida ou menor) comparado ao polipeptídeo originário de variante ou a um polipeptídeo compreendendo uma região Fc nativa quando medido em pH 6,0. Um polipeptídeo variante que manifesta ligação aumentada ou afinidade de ligação aumentada com um FcRn, se liga a FcRn com maior afinidade do que o polipeptídeo originário. Um polipeptídeo variante que manifesta ligação diminuída ou afinidade de ligação diminuída com um FcRn, se liga a FcRn com menor afinidade do que o polipeptídeo originário. Tais variantes que manifestam ligação diminuída com um FcRn podem possuir pequena ou nenhuma ligação apreciável com um FcRn, e.g., 0-20% de ligação ao FcRn comparado com um polipeptídeo originário. Um polipeptídeo variante que se liga a um FcRn com “afinidade realçada” quando comparado ao seu polipeptídeo originário, é um que se liga a FcRn com maior afinidade de ligação do que o polipeptídeo originário, quando as quantidades de polipeptídeo variante e polipeptídeo originário em um ensaio de ligação são essencialmente as mesmas, e todas as outras condições são idênticas. Por exemplo, um polipeptídeo variante com afinidade de ligação de FcRn realçada pode manifestar de cerca de 1,10 vez a cerca de 100 vezes (mais tipicamente de cerca de 1,2 vez a cerca de 50 vezes) de aumento em afinidade de ligação de FcRn comparado com o polipeptídeo originário, onde afinidade de ligação de FcRn é determinada, por exemplo, em um ensaio ELISA ou outro método disponível para um de habitual verso na arte.

[0074] Como usado neste lugar, uma “substituição de aminoácido” se refere à reposição de pelo menos um resíduo de aminoácido existente em uma dada seqüência de aminoácidos com outro diferente resíduo de aminoácido “de reposição”. O resíduo ou resíduos de reposição podem ser “resíduos de aminoácidos naturalmente ocorrentes” (i.e., codificados pelo código genético) e selecionadas de: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr); e valina (Val). Substituição com um ou mais resíduos de aminoácidos não naturalmente

ocorrentes é também abrangida pela definição de uma substituição de aminoácido neste lugar. Um “resíduo de aminoácido não naturalmente ocorrente” se refere a um resíduo, outro do que aqueles resíduos de aminoácidos naturalmente ocorrentes listados acima, que é capaz de se ligar covalentemente ao(s) resíduo(s) de aminoácido adjacente(s) em uma cadeia de polipeptídeo. Exemplos de resíduos de aminoácidos não naturalmente ocorrentes incluem norleucina, omitina, norvalina, homoserina e outros análogos de resíduo de aminoácido tal como aqueles descritos em Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202: 301-336 (1991).

[0075] O termo “sinal de ensaio” se refere à produção de qualquer método de detectar interações proteína-proteína, incluindo mas não limitado a, medidas de absorvância a partir de ensaios calorimétricos, intensidade de fluorescência, ou desintegrações por minuto. Formatos de ensaios podem incluir ELISA, facs, ou outros métodos. Uma mudança no “sinal de ensaio” pode refletir uma mudança em viabilidade de célula e/ou uma mudança na taxa-off cinética, na taxa-on cinética, ou ambas. Um “sinal de ensaio superior” se refere ao número de produção medido sendo maior do que outro número (e.g., uma variante pode ter um número medido superior (maior) em um ensaio ELISA quando comparado ao polipeptídeo originário). Um sinal de ensaio “inferior” se refere ao número de produção medido sendo menor do que outro número (e.g., uma variante pode ter um número medido inferior (menor) em um ensaio ELISA quando comparado ao polipeptídeo originário).

[0076] O termo “afinidade de ligação” se refere à constante de dissociação de equilíbrio (expressa em unidades de concentração) associada com cada interação receptor de Fc-ligação de Fc. A afinidade de ligação é diretamente relacionada com a proporção da constante de dissociação cinética (geralmente relatada em unidades de tempo inverso, e.g., segundos⁻¹) dividida pela constante de associação cinética (geralmente relatada em unidades de tempo, e.g., molar/segundo). Em geral não é possível determinar inequivocamente se mudanças em constantes de dissociação de equilíbrio são devido a diferenças em constantes de associação, constantes de dissociação ou ambas a menos que cada um destes parâmetros sejam experimentalmente determinados (e.g., por medidas BIACORE ou SAPIDYNE).

[0077] Como usado neste lugar, o termo “região de dobradiça” se refere ao esticamento de aminoácidos em IgG1 humana esticando de Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Regiões de dobradiça de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a seqüência de IgG colocando o primeiro e último resíduo de cisteína formando ligações S-S entre cadeias pesadas nas mesmas posições.

[0078] “Clq” é um polipeptídeo que inclui um sítio de ligação para a região Fc de uma imunoglobulina. Clq junto com duas serina proteases,Clr e Cls, formam o complexo Cl, o primeiro componente da via de CDC.

[0079] Como usado neste lugar, o termo “anticorpo” é usado permutavelmente com “imunoglobulina” ou “Ig”, é usado no mais amplo sentido e especificamente cobre anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento completo), anticorpos policlonais, anticorpos multi-específicos (e.g. anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos contanto que eles exibam a atividade biológica ou atividade funcional desejada. Anticorpos de cadeia simples, e anticorpos quiméricos, humanos, humanizados ou primatizados (CDR-transplantado), assim como anticorpos quiméricos ou CDR-transplantado de cadeia simples, e os semelhantes, compreendendo porções derivadas de diferentes espécies, também são abrangidos pela presente invenção e o termo “anticorpo”. As várias porções destes anticorpos podem ser unidas quimicamente por técnicas convencionais, sinteticamente, ou podem ser preparadas como uma proteína contígua usando técnicas de engenharia genética. Por exemplo, ácidos nucleicos codificando uma cadeia quimérica ou humanizada podem ser expressas para produzir uma proteína contígua. Veja, e.g., Patente Norte-Americana No. 4.816.567; Patente Européia No. 0.125.023 B1; Patente Norte-Americana No. 4.816.397; Patente Européia No. 0.120.694 B1; WO 86/01533; Patente Européia No. 0.194.276 B1; Patente Norte-Americana No. 5.225.539; Patente Européia No. 0.239.400 B1 Patente Norte-Americana Nos. 5.585.089 e 5.698.762. Veja também, Newman, R. et al. *BioTechnology*, 10:1455-1460, 1993, considerando anticorpo primatizado, e Ladner et al., Patente Norte-Americana No. 4.946.778 e Bird, R.E. et al., *Science*, 242:423-426, 1988, considerando anticorpos de cadeia simples. É entendido que

todas as formas dos anticorpos compreendendo uma região Fc (ou porção desta) são abrangidas neste lugar dentro do termo “anticorpo”. Além disso, o anticorpo pode ser marcado com uma marca detectável, imobilizado em uma fase sólida e/ou conjugado com um composto heterólogo (e.g., uma enzima ou toxina) de acordo com métodos conhecidos na arte.

[0080] Como usado neste lugar, o termo “fragmentos de anticorpos” se refere a uma porção de um anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem, mas não são limitados a, anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; peptídeos Fc ou Fc', Fab e fragmentos Fab, e anticorpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticorpos. Os fragmentos de anticorpos preferivelmente retêm pelo menos parte da dobradiça e opcionalmente a região CH1 de uma cadeia pesada de IgG. Em outras formas de realização preferidas, os fragmentos de anticorpos compreendem pelo menos uma porção da região CH2 ou a região CH2 inteira.

[0081] Como usado neste lugar, o termo “fragmento funcional”, quando usado em referência a um anticorpo monoclonal, é pretendido para se referir a uma porção do anticorpo monoclonal que ainda retém uma atividade funcional. Uma atividade funcional pode ser, por exemplo, atividade ou especificidade de ligação de antígeno, atividade ou especificidade de ligação de receptor, atividade de função efetora e as semelhantes. Fragmentos funcionais de anticorpo monoclonal incluem, por exemplo, cadeias pesadas ou leves individuais e fragmentos destas, tal como VL, VH e Fd; fragmentos monovalentes, tal como Fv, Fab, e Fab'; fragmentos bivalentes tal como F(ab')₂; Fv de cadeia simples (scFv); e fragmentos Fc. Tais termos são descritos em, por exemplo, Harlowe and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., *ell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) e em Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990). O termo fragmento funcional é pretendido para incluir, por exemplo, fragmentos produzidos por digestão ou redução

de protease de um anticorpo monoclonal e por métodos de DNA recombinante conhecidos por aqueles versados na arte.

[0082] Como usado neste lugar, o termo “fragmento” se refere a um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácidos de pelo menos 5, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 100 ou mais resíduos de aminoácidos contíguos da seqüência de aminoácidos de outro polipeptídeo. Em uma forma de realização preferida, um fragmento de um polipeptídeo retém pelo menos uma função do polipeptídeo de comprimento completo.

[0083] Como usado neste lugar, o termo “anticorpo quimérico” inclui imunoglobulinas monovalentes, desalentes ou polivalentes. Um anticorpo quimérico monovalente é um dímero formado por uma cadeia quimérica pesada associada através de pontes dissulfeto com uma cadeia quimérica leve. Um anticorpo quimérico divalente é um tetrâmero formado por dois dímeros de cadeia pesada-cadeia leve associada através de pelo menos uma ponte dissulfeto. Uma cadeia quimérica pesada de um anticorpo para uso em humanos compreende uma região de ligação de antígeno derivada da cadeia pesada de um anticorpo não humano, que é ligada a pelo menos uma porção de uma região constante de cadeia pesada humana, tal como CH1 ou CH2. Uma cadeia quimérica leve de um anticorpo para uso em humanos compreende uma região de ligação de antígeno derivada da cadeia leve de um anticorpo não humano, ligada a pelo menos uma porção de uma região constante de cadeia leve humana (CL). Anticorpos, fragmentos ou derivados tendo cadeias quiméricas pesadas e cadeias leves da mesma ou diferente especificidade de ligação de região variável, também podem ser preparados por associação apropriada das cadeias individuais de polipeptídeo, de acordo com etapas de método conhecido. Com esta abordagem, hospedeiros expressando cadeias quiméricas pesadas são cultivados separadamente de hospedeiros expressando cadeias quiméricas leves, e as cadeias de imunoglobulina são separadamente recuperadas e então associadas. Alternativamente, os hospedeiros podem ser co-cultivados e as cadeias permitidas para se associar espontaneamente no meio de cultura, seguido por recuperação da imunoglobulina reunida ou

fragmento ou ambas as cadeias pesadas e leves podem ser expressas na mesma célula hospedeira. Métodos para produzir anticorpos quiméricos são conhecidos na arte (veja, e.g., Patente Norte-Americana Nos.: 6.284.471; 5.807.715; 4.816.567; e 4.816.397).

[0084] Como usado neste lugar, formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (e.g., murina) (i.e., anticorpos humanizados) são anticorpos que contêm mínimo de seqüências, ou nenhuma seqüência, derivada de imunoglobulina não humana. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo destinatário) nas quais resíduos de uma região hiper variável do receptivo são repostos por resíduos de uma região hiper variável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas. Em algumas instâncias, resíduos de região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são repostos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptivo ou no anticorpo doador. Estas modificações são geralmente feitas para adicionalmente refinar performance de anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos as alças hiper variáveis (CDRs) correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os resíduos FR são aqueles de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Um método exemplar usado para gerar anticorpos humanizados é descrito em Patente Norte-Americana No. 5.225.539.

[0085] Como usado neste lugar, o termo “imunoadesina” designa moléculas tipo anticorpo que combinam o domínio de ligação de uma proteína “adesina” heteróloga (e.g., um receptor, ligante ou enzima) com um domínio constante de imunoglobulina. Estruturalmente, imunoadesinas compreendem uma fusão da seqüência de aminoácidos de adesina com a especificidade de ligação desejada que é outra do

que o sítio de reconhecimento e ligação de antígeno (sítio de combinação de antígeno) de um anticorpo (i.e., é “heterólogo”) com uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina.

[0086] Como usado neste lugar, o termo “domínio de ligação de receptor” se refere a qualquer receptor nativo ou qualquer região ou derivado deste retendo pelo menos uma habilidade qualitativa de ligação de ligante de um receptor nativo correspondente. Em certas formas de realização, o receptor é de um polipeptídeo de superfície celular tendo um domínio extracelular que é homólogo a um membro da supergenefamília de imunoglobulina. Outros receptores, que não são membros da supergenefamília de imunoglobulina mas são contudo especificamente cobertos por esta definição, são receptores para citocinas, e em particular receptores com atividade de tirosina quinase (tirosina quinases de receptor), membros das superfamílias de receptor de hematopoietina e fator de crescimento de nervo, e moléculas de adesão de célula (e.g., E-, L-, e P-seletinas).

[0087] Como usado neste lugar, o termo “domínio de ligação de receptor” se refere a qualquer ligante nativo para um receptor, incluindo, e.g., moléculas de adesão de célula, ou qualquer região ou derivado de tal ligante nativo retendo pelo menos uma habilidade qualitativa de ligação de receptor de um ligante nativo correspondente.

[0088] Como usado neste lugar, o termo “quimera anticorpo-immunoadesina” compreende uma molécula que combina pelo menos um domínio de ligação de um anticorpo com pelo menos uma imunoadesina. Exemplos incluem, mas não são limitados a, quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas em Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) e Charnow et al., J. Immunol., 153:4268 (1994).

[0089] Como usado neste lugar, um polipeptídeo “isolado” é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente em seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que iriam interferir em usos diagnósticos ou terapêuticos para o polipeptídeo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em certas formas de realização, o polipeptídeo isolado é purificado (1) para mais do que

95% em peso de polipeptídeos como determinado pelo método de Lowry, e preferivelmente, mais do que 99% em peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de seqüência de aminoácidos N-terminal ou intenal por uso de um seqüenciador de alta rotação, ou (3) para homogeneidade por SDS-page sob condições redutoras ou não redutoras usando corante azul de Coomassie ou prata. Polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo in situ dentro de células recombinantes desde que pelo menos um componente do ambiente natural de polipeptídeo não esteja presente. Habitualmente, entretanto, polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0090] Como usado neste lugar, o termo “tratamento” se refere a ambos tratamentos terapêutico e profilático ou medidas preventivas. Aqueles sujeitos ou pacientes com necessidade de tratamento incluem aqueles já com a desordem assim como aqueles nos quais a desordem está para ser prevenida.

[0091] Como usado neste lugar, os termos “desordem” e “doença” são usados permutavelmente para se referir a qualquer condição que iria se beneficiar de tratamento com um polipeptídeo variante (um polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção), incluindo desordens ou doenças crônicas e agudas (e.g., condições patológicas que predisõem um paciente a uma desordem particular). Em certas formas de realização, o termo “doença auto-imune” é usado permutavelmente com o termo “desordem auto-imune” para se referir a uma condição em um sujeito caracterizado por injúria celular, de tecido e/ou órgão causada por uma reação imunológica do sujeito para suas próprias células, tecidos e/ou órgãos. O termo “doença inflamatória” é usado permutavelmente com o termo “desordem inflamatória” para se referir a uma condição em um sujeito caracterizado por inflamação. Desordens auto-íunes podem ou não ser associadas com inflamação. Além disso, inflamação pode ou não ser causada por desordem auto-imune. Certas desordens podem ser caracterizadas como ambas desordens auto-íunes e inflamatórias.

[0092] Como usado neste lugar, os termos “câncer” e “canceroso” se referem a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada

por crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas não são limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem câncer de célula esquamosa, câncer de pulmão de célula pequena, câncer de pulmão de célula não pequena, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma esquamoso de pulmão, câncer de peritônio, câncer hepatocelular, câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de colo, câncer coloretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer de rim, câncer de fígado, câncer de próstata, câncer de vulva, câncer de tireóide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer de cabeça e pescoço. Como usado neste lugar, o termo “marca” se refere a um composto ou composição detectável que é conjugado diretamente ou indiretamente a um polipeptídeo. A marca pode por si própria ser detectável (e.g. marcas de radioisótopos ou marcas fluorescentes) ou, no caso de uma marca enzimática, pode catalisar alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável.

[0093] Como usado neste lugar, o termo “receptor” se refere a um polipeptídeo capaz de se ligar à pelo menos um ligante. O receptor preferido é um receptor de superfície celular ou solúvel tendo um domínio extracelular de ligação de ligante e, opcionalmente, outros domínios (e.g., domínio transmembrana, domínio intracelular e/ou âncora de membrana). Um receptor a ser avaliado em um ensaio descrito neste lugar pode ser um receptor intacto ou um fragmento ou derivado deste (e.g. uma proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação do receptor fusionado a um ou mais polipeptídeos heterólogos). Além disso, receptor a ser avaliado para suas propriedades de ligação pode estar presente em uma célula ou isolado e opcionalmente revestido em uma placa de ensaio ou alguma outra fase sólida ou marcado diretamente e usado como uma sonda.

[0094] Como usado neste lugar, o termo “doença responsiva a anticorpo” se refere a qualquer doença ou condição médica que é mostrada ser tratável, pelo menos em parte, com terapia de anticorpo. Exemplos de tais doenças e condições

médicas incluem, mas não são limitados a, linfoma (mostrado ser tratável com RITUXAN), doença infecciosa (vírus sincial respiratório mostrado ser tratável com SYNAGIS), transplante de rim (ZENAPAX mostrou ser útil), doença de Crohn e artrite reumatóide (mostrado ser tratável com REMICADE), carcinoma de mama (mostrado ser tratável com HERCEPTIN), e câncer de colo (mostrado ser tratável com EDRECOLOMAB). Como usado neste lugar, o termo “doença responsiva a imunoadesina”, se refere a qualquer doença ou condição médica que é mostrada ser tratável, pelo menos em parte, com terapia de imunoadesina.

[0095] Como usado neste lugar um polipeptídeo variante que “media citotoxicidade célula-mediada dependente de anticorpo (ADCC) na presença de células efectoras humanas mais efetivamente” do que um anticorpo originário é um que in vitro ou in vivo é substancialmente mais efetivo em mediar ADCC, quando as quantidades usadas de polipeptídeo variante e anticorpo originário no ensaio são essencialmente as mesmas. Por exemplo, uma tal variante causa uma quantidade superior de lise de célula alvo em um dado ensaio de ADCC do que o polipeptídeo originário em um ensaio de ADCC idêntico. Tais variantes podem ser identificadas, por exemplo, usando um ensaio de ADCC, mas outros ensaios e métodos para determinar atividade de ADCC também podem ser empregados (e.g., modelos animais). Em formas de realização preferidas, o polipeptídeo variante é de cerca de 1,2, 1,3 ou 1,4 vez, 1,5 vez, 50 vezes, 100 vezes, cerca de 500 vezes, ou cerca de 1000 vezes mais efetivo em mediar ADCC do que o polipeptídeo originário.

[0096] O termo “sintomas de uma doença responsiva a anticorpo ou imunoadesina” se refere àqueles sintomas geralmente associados com uma doença particular. Por exemplo, os sintomas geralmente associados com a doença de Crohn incluem: dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso, febre, perda de apetite, desidratação, anemia, distensão, fibrose, intestinos inflamados e desnutrição. A frase “sob condições tais que os sintomas são reduzidos” se refere a qualquer grau de redução qualitativa ou quantitativa em sintomas detectáveis de qualquer doença responsiva a anticorpo ou imunoglobulina, incluindo mas não limitados a, um impacto detectável na taxa de recuperação de doença (e.g., taxa de

ganho de peso), ou a redução de pelo menos um dos sintomas normalmente associados com a doença particular (e.g., se a doença responsiva a anticorpo ou imunoglobulina fosse doença de Crohn, uma redução de pelo menos um dos seguintes sintomas: dor abdominal, diarréia, sangramento retal, perda de peso, febre, perda de apetite, desidratação, anemia, distensão, fibrose, intestinos inflamados e desnutrição).

Anticorpos Monoclonais e Receptores

[0097] Um anticorpo de comprimento completo (“Imunoglobulina” ou “Ig”) como ele existe naturalmente é uma molécula de imunoglobulina compreendida por quatro cadeias de peptídeo, duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50-70 kDa quando de comprimento completo) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa quando de comprimento completo) interconectadas por pontes dissulfeto. A porção amino terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110 ou mais aminoácidos primariamente responsável por reconhecimento de antígeno. A porção carboxi terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável por função efetora.

[0098] Cadeias leves são classificadas como kappa ou lâmbda e caracterizadas por uma região constante particular. Cadeias pesadas são classificadas como gama, um, alfa, delta, ou epsilon, e definem os isotipos de anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular.

[0099] Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável de cadeia pesada (neste lugar “HCVR”) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios (CH1, CH2, e CH3) para IgG, IgD, e IgA; e 4 domínios (CH1, CH2, CH3, e CH4) para IgM e IgE. Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável de cadeia leve (neste lugar “LCVR”) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios. As regiões HCVR e LCVR podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hiperatividade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), transpostas com regiões que são

mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada HCVR e LCVR é composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas do término amino para o término carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. A designação de aminoácidos para cada domínio é em conformidade com convenções bem conhecidas [e.g., Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. A habilidade funcional de um anticorpo para se ligar a um antígeno particular é determinada coletivamente pelos seis CDRs. Entretanto, mesmo um domínio variável único compreendendo apenas três CDRs específico para um antígeno pode ter a habilidade para reconhecer e se ligar ao antígeno, embora com uma menor afinidade do que um Fab completo.

[0100] Anticorpos monoclonais da invenção podem ser produzidos usando e.g., técnicas de hibridoma bem conhecidas na arte, assim como tecnologias recombinantes, tecnologias de manifestação de fago, tecnologias sintéticas ou combinações de tais tecnologias prontamente conhecidas na arte. O termo "anticorpo monoclonal" como usado neste lugar não é limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. "Anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo que é derivado de uma cópia única ou clone, incluindo e.g. qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago, e não ao método pelo qual é produzido. Um "anticorpo monoclonal" pode ser um anticorpo intacto (completo ou de comprimento completo), um anticorpo substancialmente intacto, um fragmento funcional de um anticorpo, ou ele pode ser um anticorpo quimérico, anticorpo humano, ou anticorpo humanizado.

[0101] Uma população de "anticorpos monoclonais" se refere a uma população de anticorpos homogênea ou substancialmente homogênea (ou pura) (i.e., pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% ou 98% ou mais preferivelmente pelo menos 99% dos anticorpos na população são idênticos e iriam competir em um ensaio ELISA pelo mesmo antígeno ou epítipo).

[0102] O termo "se liga especificamente" ou "se liga preferencialmente" como usado neste lugar se refere à situação na qual um membro de um par de ligação

específico não se liga significativamente a outras moléculas do que seu parceiro de ligação específico. O termo também é aplicável onde e.g., um domínio de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção é específico para um epítipo particular que é carregado por diversos antígenos, em cujo caso o anticorpo específico carregando o domínio de ligação de antígeno irá ser capaz de se ligar aos vários antígenos carregando o epítipo.

[0103] A região Fc se refere à porção de um anticorpo intacto, e.g., IgG, gerada por digestão com a enzima papaína (veja Fig. 1). A região Fc é um homodímero com cada cadeia sendo compreendida de uma porção da região de dobradiça assim como os domínios CH2 e CH3. A região Fc é um dímero devido a pontes dissulfeto entre cadeias formadas entre as regiões de dobradiça e ligações não covalentes múltiplas entre os domínios CH3. IgG é a classe mais abundante de Ig no corpo, constituindo aproximadamente 75% da imunoglobulina total e distribuída igualmente dentro das combinações intravascular e extravascular. Muito pouca IgG é produzida durante os estágios anteriores da resposta primária a antígeno mas é a principal forma de anticorpo produzida durante a resposta secundária.

[0104] Como descrito acima, anticorpos têm regiões, primariamente as regiões CH2 e CH3, que são envolvidas em funções de ligação de não antígeno. Juntas, estas regiões e uma porção da seqüência de conexão são geralmente conhecidas como a região Fc, e têm diversas funções efetoras mediadas por ligação de moléculas efetoras.

[0105] As funções efetoras mediadas pela região Fc de anticorpo podem ser divididas em duas categorias: (1) funções efetoras que operam depois da ligação de anticorpo a um antígeno (estas funções envolvem, por exemplo, a participação da cascata de complemento ou células transportando receptor de Fc (FcR)); e (2) funções efetoras que operam independentemente de ligação de antígeno (estas funções conferem, por exemplo, persistência na circulação e a habilidade de ser transferido através de barreiras celulares por transcitose). Por exemplo, ligação do componente C1q de complemento a anticorpos, ativa o sistema de complemento. Seguindo opsonização, ativação de complemento é importante na lise de patógenos

de célula. A ativação de complemento também estimula a resposta inflamatória e também pode estar envolvida em hipersensibilidade auto-imune. Ademias, anticorpos se ligam a células através da região Fc, com um sítio de ligação de receptor de Fc na região Fc de anticorpo se ligando a um Fc em uma célula. Existem diversos FcRs que são específicos para diferentes classes de anticorpo, incluindo IgG, IgE, IgA e IgM. Enquanto a presente invenção não é limitada por um mecanismo particular, ligação de anticorpo a FcR em superfícies celulares desencadeia várias importantes e diversas respostas biológicas incluindo englobamento e destruição de partículas revestidas com anticorpo, depuração de complexos imunes, lise de células alvo revestidas com anticorpo por células assassinas (ADCC), liberação de mediadores inflamatórios, transferência placentária e controle de produção de imunoglobulina.

[0106] Diversas funções efetoras de anticorpo são mediadas por FcRs, que se ligam à região Fc de um anticorpo. FcRs são definidos por sua especificidade para isotipos de imunoglobulina; receptores de Fc para anticorpos IgG são referidos como FcγR, para IgE com FcεR, para IgA como FcαR e assim por diante. Três subclasses de FcγR foram identificadas: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16).

[0107] Pelo fato de cada subclasse de FcγR ser codificada por dois ou três genes, um processamento alternativo de RNA leva a transcritos múltiplos, existe uma ampla diversidade de isoformas de FcγR. Os três genes codificando a subclasse FcγRI (FcγRIA, FcγRIB e FcγRIC) são agrupados na região 1q21.1 do braço longo de cromossomo 1; os genes codificando isoformas de FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB e FcγRIIC) e os dois genes codificando FcγRIII (FcγRIIIA e FcγRIIIB) são agrupados na região 1q22. Estes diferentes subtipos de FcR são expressos em diferentes tipos de célula (e.g., Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)). Por exemplo, em humanos, FcγRIIIB é encontrado apenas em neutrófilos, ao passo que FcγRIIIA é encontrado em macrófagos, monócitos, células NK, e uma subpopulação de células-T. Notavelmente, FcγRIIIA está presente em células NK, um dos tipos celulares implicados em ADCC.

[0108] Receptor FcγRIIIA humano (CD16) tem um polimorfismo comum em

posição 158 em seu domínio extracelular codificando ou uma fenilalanina ou valina nesta posição. O alelo V de FcγRIIIA tem afinidade superior à IgG1 humana do que o alelo F. O alelo V158 também media ADCC mais eficientemente. Dados clínicos mostraram uma correlação entre o genótipo de receptor FcγRIIIA em pacientes passando por tratamento com Rituxan e resposta terapêutica. Ambas as respostas clínica e molecular e tempo para progressão foram mostrados serem superiores em pacientes homocigotos para o genótipo FcγRIIIA-158V (aproximadamente 20% da população). Em contraste, pacientes heterocigotos ou homocigotos para o genótipo de afinidade inferior FcγRIIIA-158F (aproximadamente 80% da população) respondem mais insuficientemente. Estes dados sugerem que mutações de Fc que realçam atividade de ADCC dos portadores de 158F podem realçar a eficácia clínica de terapia de câncer baseada em anticorpo. Um polimorfismo genético também está presente em receptor FcγRIIA humano (CD32) em posição 131 em seu domínio extracelular codificando ou uma histidina (H) ou arginina (R) nesta posição. O polimorfismo na posição 131 foi encontrado afetar sua habilidade para se ligar a IgG humana. Dados recentes também mostram uma correlação entre o polimorfismo de posição 131 de FcγRIIA e resposta clínica a Rituxan. Pacientes homocigotos para o alelo H131 tiveram uma taxa de resposta significativamente maior do que os outros 2 grupos.

[0109] FcγRI, FcγRII e FcγRIII são receptores de superfamília de imunoglobulina (IgSF); FcγRI tem três domínios IgSF em seu domínio extracelular, enquanto FcγRII e FcγRIII têm apenas dois domínios IgSF em seus domínios extracelulares. Outro tipo de receptor de Fc é o receptor de Fc neonatal (FcRn). FcRn é estruturalmente similar ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e consiste de uma cadeia-α ligada não covalentemente a β2-microglobulina.

Regiões Fc Variantes

[0110] A presente invenção fornece polipeptídeos variantes, seqüências de ácidos nucleicos codificando os polipeptídeos variantes, e métodos para gerar polipeptídeos variantes. Preferivelmente, os polipeptídeos variantes da presente invenção diferem de um polipeptídeo originário por pelo menos uma modificação de

aminoácido, preferivelmente uma substituição de aminoácido. Um polipeptídeo “originário”, “tipo selvagem”, “inicial” ou “não variante” preferivelmente compreende pelo menos uma porção de uma região Fc de anticorpo e a substituição de aminoácido no polipeptídeo variante ocorre dentro da região Fc. Um polipeptídeo originário compreendendo uma região Fc pode ser preparado usando técnicas disponíveis na arte para gerar polipeptídeos compreendendo uma região Fc ou porção desta. Em formas de realização preferidas, o polipeptídeo originário é um anticorpo. Entretanto, o polipeptídeo originário pode ser qualquer outro polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região Fc (e.g., uma imunoadesina). A porção de região Fc no polipeptídeo originário pode ser de uma seqüência nativa ou não nativa, preferivelmente ela é uma seqüência nativa de origem humana. Em certas formas de realização, uma região Fc variante pode ser gerada (e.g. de acordo com os métodos descritos neste lugar) e pode ser fusionada a um polipeptídeo heterólogo de escolha, tal como um domínio variável de anticorpo ou domínio de ligação de um receptor ou ligante, ou qualquer polipeptídeo terapêutico.

[0111] Em formas de realização preferidas, o polipeptídeo originário compreende uma região c ou porção funcional desta. Geralmente, a região Fc do polipeptídeo originário irá compreender uma região Fc de seqüência nativa, e preferivelmente uma região Fc de seqüência nativa humana. Entretanto, a região Fc do polipeptídeo originário pode ter uma ou mais alterações ou modificações pré-existentes de seqüência de aminoácidos (e.g., uma substituição de aminoácido) de uma região Fc de seqüência nativa. Por exemplo, a atividade de ligação de Clq da região Fc pode ter sido previamente alterada ou a afinidade de ligação de FcγR da região Fc pode ter sido alterada. A região Fc variante desejada ou ácido nucleico codificando a região Fc variante de interesse podem ser construídos enquanto não operavelmente ligados ao parceiro de fusão desejado da região Fc variante, (e.g., uma região variável de anticorpo, uma proteína heteróloga) e então subseqüentemente engenheirados para serem operavelmente ligados a este. Em formas de realização adicionais, a região Fc de polipeptídeo originário é conceitual (e.g., pensamento

mental ou uma representação visual em um computador ou em papel) e, enquanto eles não existem fisicamente, o engenheiro de anticorpo pode decidir por uma seqüência de aminoácidos de região Fc variante desejada e gerar um polipeptídeo compreendendo tal seqüência ou um DNA codificando a seqüência de aminoácidos de região Fc variante desejada. Entretanto, em formas de realização preferidas, um ácido nucleico codificando uma região Fc de um polipeptídeo originário é disponível e esta seqüência de ácidos nucleicos pe alterada para gerar uma seqüência de ácidos nucleicos variante codificando a região Fc variante.

[0112] Ácido nucleico codificando uma variante do polipeptídeo originário (ou simplesmente uma região Fc variante) pode ser preparado por métodos conhecidos na arte usando a orientação do presente relatório para seqüências particulares. Estes métodos incluem, mas não são limitados a, preparação por mutagênese sítio-dirigida (ou mediada por oligonucleotídeo), mutagênese por PCR (e.g., Vallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)), e mutagênese de gaveta (e.g., Wells et al., Gene 34:315-323 (1985)) de um ácido nucleico anteriormente preparado codificando o polipeptídeo. Mutagênese sítio-dirigida é um método preferido para preparar variantes. Esta técnica é bem conhecida na arte (veja, e.g., Carter et al. Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443 (1985) e Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1987)).

[0113] Alternativamente, ou adicionalmente, a seqüência de aminoácidos desejada codificando um polipeptídeo variante pode ser determinada, e uma seqüência de ácidos nucleicos codificando tal seqüência de aminoácidos do polipeptídeo variante (i.e., polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante compreendendo uma substituição de aminoácido como descrito neste lugar) podem ser geradas sinteticamente. Isto é ainda considerado como sendo uma região Fc variante de uma região Fc originário mesmo embora a região Fc originário não tenha sido o precursor molecular da região Fc variante mas foi ao invés a seqüência de aminoácidos da região Fc presente na originária na ausência da substituição de aminoácido desejada.

[0114] A seqüência de aminoácidos do polipeptídeo originário pode ser

modificada a fim de gerar uma região Fc variante com afinidade ou atividade alterada de ligação de receptor de Fc in vitro e/ou in vivo; e/ou atividade de ADCC alterada in vitro e/ou in vivo; e/ou atividade de CDC alterada in vitro e/ou in vivo. A seqüência de aminoácidos do polipeptídeo originário também pode ser modificada a fim de gerar uma região Fc variante com propriedades alteradas de ligação de complemento e/ou meia vida de circulação.

[0115] Modificações substanciais nas propriedades biológicas da região Fc podem ser realizadas selecionando substituições de aminoácidos que diferem significativamente em seus efeitos ao alterar (a) a estrutura do polipeptídeo primário na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de folha ou de hélice, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou o corpo da cadeia lateral, (d) interação com carboidrato ou (e) flexibilidade de movimento de domínio. Resíduos naturalmente ocorrentes são divididos em classes baseados em propriedades comuns de cadeia lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam orientação de cadeia: gly, pro; e
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

[0116] Substituições não conservativas irão acarretar em trocar um membro de uma destas classes por um membro de outra classe. Substituições conservativas irão acarretar em trocar um membro de uma destas classes por outro membro da mesma classe.

[0117] Como é demonstrado nos Exemplos abaixo, alguém pode engenheirar uma região Fc variante com atividade alterada (função(ões) efetora(s) e/ou farmacocinética). Alguém pode, por exemplo, modificar um ou mais resíduos de aminoácidos da região Fc a fim de alterar (e.g., aumentar ou diminuir) atividade de ADCC ou atividade de CDC ou afinidade de ligação de FcRn. Em formas de realização preferidas, uma modificação é uma substituição como listado na Tabela 1

neste lugar. Geralmente, alguém irá fazer uma substituição de aminoácido em um ou mais dos resíduos de região Fc identificados neste lugar como afetando atividade de ADCC a fim de gerar tal região Fc variante. Em formas de realização preferidas, não mais do que um a cerca de dez resíduos de região Fc serão substituídos. As regiões Fc neste lugar compreendendo uma ou mais substituições de aminoácidos irão preferivelmente reter pelo menos cerca de 80%, e preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, da seqüência de região Fc originário ou de uma seqüência de região Fc humana nativa.

[0118] Introduzindo a(s) modificação(ões) de seqüência de aminoácidos apropriada(s) em uma região Fc originário, alguém pode gerar uma região Fc variante que (quando comparada à região Fc originário) (a) media ADCC na presença de células efectoras humanas mais ou menos efetivamente e/ou (b) media CDC na presença de complemento humano mais ou menos efetivamente e/ou (c) se liga a Clq com uma afinidade desejada e/ou (d) se liga a um receptor gama de Fc (FcγR) ou receptor neonatal de Fc (FcRn) com uma afinidade desejada. Tais regiões Fc variantes irão geralmente compreender pelo menos uma modificação de aminoácido na região Fc. Preferivelmente a modificação é uma substituição de aminoácido, mais preferivelmente uma substituição de aminoácido como listado nas Tabelas 1-9 neste lugar.

[0119] Em formas de realização preferidas, a região Fc de polipeptídeo originário é uma região Fc humana ou fragmento funcional desta, e.g., uma IgG1 humana de região Fc humana nativa (alótipos f e a,z), IgG2, IgG3, IgG4, e todos os alótipos conhecidos ou descobertos de qualquer espécie. Tais regiões têm seqüências nativas tal como, e.g., aquelas mostradas na Fig. 2 (SEQ ID NOs: 1-8) e Fig. 3 (SEQ ID NOs: 9-12) neste lugar.

[0120] Em certas formas de realização, a fim de gerar uma região Fc variante com atividade de ADCC realçada, o polipeptídeo originário preferivelmente tem atividade de ADCC pré-existente (e.g. o polipeptídeo originário compreende uma região Fc de IgG1 humana ou IgG3 humana). Em algumas formas de realização, uma variante tem atividade de ADCC realçada (e.g., níveis maiores quando

comparado ao originário de acordo com um ensaio de ADCC descrito neste lugar) quando comparado ao polipeptídeo originário, i.e., um anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante tem atividade de ADCC realçada quando comparado sob circunstâncias idênticas a um anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário ou uma seqüência nativa de região Fc de IgG1 ou IgG3 mas de outra maneira idêntico ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante.

[0121] Em formas de realização preferidas, substituições de aminoácidos são introduzidas nos domínios CH2 e/ou CH3 de uma região Fc. Em formas de realização preferidas, a região Fc originário usada como modelo para gerar tais variantes compreende uma região Fc de IgG humana.

[0122] Em certas formas de realização, a fim de gerar uma região Fc variante com atividade de CDC realçada, o polipeptídeo originário preferivelmente tem atividade de CDC pré-existente. Em algumas formas de realização, uma variante tem atividade de CDC realçada (e.g., níveis maiores quando comparado ao originário de acordo com um ensaio de CDC descrito neste lugar) quando comparado ao polipeptídeo originário, i.e., um anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante tem atividade de CDC realçada quando comparado sob circunstâncias idênticas a um anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc originário ou uma seqüência nativa de região Fc de IgG1 ou IgG3 mas de outra maneira idêntico ao anticorpo monoclonal compreendendo a região Fc variante.

[0123] Os polipeptídeos variantes descritos neste lugar podem ser sujeitos a modificações adicionais, dependendo do uso desejado ou pretendido do polipeptídeo. Tais modificações podem envolver, por exemplo, alteração adicional da seqüência de aminoácidos (substituição, inserção e/ou deleção de resíduos de aminoácidos), modificações de carboidrato, fusão a polipeptídeo(s) heterólogo(s) e/ou modificações covalentes. Tais modificações adicionais podem ser feitas antes de, simultaneamente com, ou seguindo, as modificações de aminoácido descritas neste lugar que resultam em uma alteração de ligação de receptor de Fc e/ou atividade de ADCC e/ou atividade de CDC.

[0124] Alternativamente ou adicionalmente, pode ser útil combinar modificações de aminoácidos com uma ou mais modificações de aminoácidos que alteram ligação de Clq e/ou função de CDC da região Fc. Por exemplo, o polipeptídeo inicial pode ser incapaz de se ligar a Clq e/ou mediar CDC e pode ser modificado de acordo com os ensinamentos neste lugar de forma que ele adquira estas funções efetoras adicionais. Além disso, polipeptídeos com atividade de ligação de Clq pré-existente, opcionalmente adicionalmente tendo a habilidade para mediar CDC, podem ser modificados de forma que uma ou ambas destas atividades são realçadas (ou alternativamente, são diminuídas). Certas modificações de aminoácidos de região Fc que alteram ligação de Clq e/ou modificam atividade de CDC são descritas neste lugar (veja Tabelas 2, 7, 8 e 10) e, por exemplo, em WO0042072.

[0125] Como descrito acima, alguém pode projetar uma região Fc ou porção desta com função efetora alterada, e.g., modificando atividade de CDC e/ou atividade de ADCC. Por exemplo, alguém pode gerar uma região Fc variante com melhorada atividade de CDC e melhorada atividade de ADCC. Alternativamente, onde alguém deseja que uma função efetora seja reduzida ou desgastada, alguém pode engenheirar uma região Fc variante com reduzida atividade de CDC e/ou reduzida atividade de ADCC. Em outras formas de realização, alguém pode aumentar apenas uma destas atividades, e opcionalmente também reduzir a outra atividade, e.g., para gerar uma região Fc variante com melhorada atividade de ADCC, mas reduzida atividade de CDC e vice versa. Adicionalmente, alguém pode engenheirar uma região Fc variante com modificada afinidade de ligação a FcRn, proteína A, e/ou outras proteínas de ligação de Fc.

[0126] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece composições compreendendo uma variante de um polipeptídeo originário, caracterizada pelo fato de que o originário compreende uma região Fc (ou porção desta) e caracterizada pelo fato de que a variante compreende pelo menos uma modificação de resíduo de aminoácido de superfície dentro da região Fc (veja, e.g., Deisenhofer, *Biochemistry*, 20:2361-70, April 1981, e WO0042072). Em outras formas de realização, a presente invenção fornece composições compreendendo

uma variante de um polipeptídeo originário tendo uma região Fc, caracterizada pelo fato de que o originário compreende uma região Fc (ou porção desta) e caracterizada pelo fato de que a variante compreende pelo menos uma modificação de resíduo de aminoácido de não superfície na região Fc. Em formas de realização adicionais, a presente invenção compreende uma variante de um polipeptídeo originário tendo uma região Fc, caracterizada pelo fato de que a variante compreende pelo menos uma modificação de aminoácido de superfície e pelo menos uma modificação de aminoácido de não superfície, ambas na região Fc.

Variantes de Combinação

[0127] Em algumas formas de realização, uma região Fc variante da presente invenção compreende duas ou mais modificações de aminoácidos (e.g., substituições). Tais variantes de combinação podem ser produzidas, por exemplo, selecionando duas ou mais das substituições de aminoácidos detalhadas acima (e.g., veja Tabela 1), ou uma ou mais substituições de aminoácidos como listado na Tabela 1 em adição a uma substituição conhecida na arte.

[0128] As variantes de combinação mostradas na Tabela 10 e outras variantes de combinação (tal como aquelas substituições descritas em usos de WO0042072 em combinação com aquelas descritas neste lugar) podem ser testadas para uma dada atividade (e.g., atividade de ligação de FcRn, atividade de ADCC, e atividade de CDC) em uma variedade de ensaios (veja exemplos abaixo). Sob esse aspecto, variantes de combinação úteis podem ser identificadas.

[0129] Em certas formas de realização preferidas, as múltiplas substituições de aminoácidos presentes em uma região Fc variante da presente invenção têm uma substituição de aminoácido que aumenta atividade de ADCC, e uma modificação de aminoácido que aumenta afinidade de ligação de receptor de Fc neonatal (FcRn) (e.g., em pH 6,0) do polipeptídeo compreendendo a região Fc variante. Em outras formas de realização, as variantes de combinação da presente invenção têm um aminoácido de superfície em uma região Fc variante da presente invenção, e uma modificação de aminoácido de não superfície. Variantes de combinação adicionais nas regiões Fc variantes da presente invenção podem ser geradas combinando

duas ou mais das substituições de aminoácidos descritas neste lugar, ou pelo menos uma das substituições de aminoácidos descritas neste lugar com aquelas descritas em e.g., WO0042072.

Ensaio de Polipeptídeo Variante

[0130] A presente invenção fornece vários ensaios para selecionar regiões Fc ou polipeptídeos variantes compreendendo uma região Fc variante da invenção. Ensaio de seleção podem ser usados para encontrar ou confirmar variantes úteis. Por exemplo, variantes de combinação (veja, e.g., Tabela 10) podem ser selecionadas para encontrar variantes com ligação de FcR alterada, e/ou ADCC alterada e/ou atividade de CDC alterada (e.g., atividade de ADCC ou CDC aumentada ou diminuída) e/ou habilidade modificada para reduzir células alvo (células B, por e.g.) de todo sangue. Também, como descrito abaixo, os ensaios da presente invenção podem ser empregados para encontrar ou confirmar variantes que têm atividade terapêutica benéfica em um sujeito (e.g., tal como um humano com sintomas de uma doença responsiva a anticorpo ou imunoadesina). Uma variedade de tipos de ensaio pode ser empregada para avaliar qualquer mudança em uma variante comparado com o polipeptídeo originário (ensaio de seleção fornecidos e.g., em WO0042072). Ensaio exemplares adicionais são descritos abaixo.

[0131] Em formas de realização preferidas, um polipeptídeo variante (i.e., polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da presente invenção ou porção funcional deste) é um anticorpo monoclonal que essencialmente retém a habilidade para se ligar especificamente a um antígeno (através de uma região de ligação de antígeno não modificada ou região de ligação de antígeno modificada) quando comparado com o polipeptídeo originário (e.g., a capacidade de ligação é preferivelmente menos do que 20 vezes, 10 vezes, 7 vezes, ou menos do que cerca de 5 vezes diferente do que aquela do polipeptídeo originário). A capacidade de ligação do polipeptídeo variante a antígeno pode ser determinada usando técnicas tais como ELISA, análise classificação de célula ativada por fluorescência (FACS), ou radioimunoprecipitação (RIA), por exemplo ensaios de ligação de FcR podem ser

empregados para avaliar as variantes da presente invenção. Por exemplo, ligação de receptores de Fc tal como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII, FcRn, etc., pode ser medida por titulação de um polipeptídeo variante e medindo polipeptídeo variante ligado usando um anticorpo que se liga ao polipeptídeo variante em um formato ELISA (veja Exemplos abaixo). Por exemplo, uma variante que compreende um anticorpo pode ser selecionada em um ensaio ELISA padrão para determinar ligação a um FcRn em pH 6,0 e pH 7,0 ou pH 7,4. Uma superfície sólida revestida com estreptavidina ou neutravidina pode ser usada para capturar FcRn marcado com biotina de qualquer espécie, tal como camundongo ou humano. Depois de bloqueio, o receptor de captura pode ser incubado com vários polipeptídeos variantes (e.g., anticorpos) diluídos em tampões em pH 6,0 ou pH 7,0. Na etapa seguinte uma molécula específica para anticorpos humanos é adicionada (Fab anti-humano de cabra (Fab')₂ conjugado com uma enzima). Depois disso um substrato pode ser adicionado a fim de determinar a quantidade de ligação do polipeptídeo variante ao FcRn imobilizado em pH 6,0 ou pH 7,0 ou pH 7,4. Os resultados deste ensaio podem ser comparados com a habilidade de polipeptídeo originário (não variante) para se ligar ao mesmo FcR. Em outras formas de realização preferidas, os componentes para realizar um ELISA (e.g., com FcRn) para selecionar variantes são empacotados em um kit (e.g., com instruções para uso).

[0132] Um ensaio de ADCC também pode ser empregado para selecionar as variantes da presente invenção. Ensaios de ADCC podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Para verificar atividade de ADCC de um polipeptídeo variante um ensaio de ADCC *in vitro* pode ser realizado usando proporções variantes de efetora:alvo. Um ensaio de ADCC exemplar poderia usar uma linhagem de célula alvo expressando qualquer dos seguintes antígenos alvo: CD20, CD22, CD33, CD40, CD63, receptor de EGF, receptor de her-2, antígeno de membrana próstata-específico, carboidrato de LewisY, gangliosídeos GD2 e GD3, lamp-i, CO-029, L6, e ephA2. Células efetoras podem ser obtidas a partir de um doador saudável (e.g., no dia do experimento) e PMBC purificado usando Histopaque (Sigma). Células alvo são então pré-incubadas com uma IgG compreendendo uma região Fc variante da

invenção em, por exemplo, 0,1 – 1.000 ng/ml por cerca de 30 minutos antes de misturar com células efetoras em proporções efetora:alvo de, por exemplo, 40:1, 20:1 e 10:1. Atividade de ADCC pode então ser medida colorimetricamente usando um Kit de Detecção de Citotoxicidade (Roche Molecular Biochemicals) para a quantificação de morte e lise de célula com a medição de atividade de lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células danificadas no sobrenadante. Atividade de ADCC também pode ser medida, para ensaios de célula alvo carregada com cromo, medindo o cromo 51 liberado resultante. Citotoxicidade celular independente de anticorpo pode ser determinada medindo a atividade de LDH de células alvo e efetoras na ausência de anticorpo. Liberação total pode ser medida seguindo a adição de 1% de Triton X-100 à mistura de células alvo e efetoras. Incubação das células alvo e efetoras pode ser realizada por um período de tempo otimizado (0,54-18 horas) a 37 °C em 5,0% de CO₂ e então ser seguida por centrifugação das placas de ensaio. Os sobrenadantes podem então ser transferidos para placas de 96 poços e incubados com reagente de detecção de LDH por 30 minutos a 25 °C. A absorbância da amostra pode então ser medida a 490 nm usando um leitor de microplaca. A citotoxicidade percentual pode então ser calculada usando a seguinte equação: % citotoxicidade = valor experimental – controle baixo / controle alto – controle baixo X 100%. A citotoxicidade percentual de anti-CD20 e variantes pode então ser comparada diretamente com igual quantidade de RITUXAN para fornecer uma medida de efetividade relativa. Um ensaio de ADCC exemplar poderia empregar células SKW6.4 sobre-expressando o antígeno CD20 (e.g., adquirido da American Type Culture Collection) como a fonte de células alvo. Muitas variações deste ensaio são conhecidas na arte (e.g. Zuckerman et al., CRC Crit Rev Microbiol 1978;7(1):1-26).

[0133] Células efetoras úteis para tais ensaios incluem, mas não são limitadas à, células NK, macrófagos, e outros PBMC. Alternativamente, ou adicionalmente, atividade de ADCC dos polipeptídeos variantes da presente invenção pode ser verificada in vivo, e.g., em um modelo animal tal como aqueles descritos em Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

[0134] As variantes da presente invenção também podem ser selecionadas para ativação de complemento. Para verificar ativação de complemento, um ensaio de CDC pode ser realizado (Veja, e.g., Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)). Por exemplo, várias concentrações do polipeptídeo variante e complemento humano podem ser diluídas com tampão. Células que expressam o antígeno ao qual o polipeptídeo variante se liga podem ser diluídas para uma densidade de 1×10^6 células/ml. Misturas de polipeptídeo variante, complemento humano diluído e células expressando o antígeno podem ser adicionadas a uma placa de 96 poços de fundo plano de cultura de tecido e permitidos para incubar por 2 horas a 37 °C e 5,0% de CO₂ para facilitar lise de célula mediada por complemento. Cinquenta microlitros de azul de alamar (Accumed International) podem ser adicionados a cada poço e incubados durante a noite a 37 °C. A absorbância pode ser medida usando um fluorímetro de 96 poços com excitação em 530 nm e emissão em 590 nm. Os resultados podem ser expressos em unidades de fluorescência relativa (RFU). As concentrações de amostras podem ser computadas a partir de uma curva padrão e a atividade percentual quando comparada a polipeptídeo não variante pode ser relatada para o polipeptídeo variante de interesse.

[0135] Em certas formas de realização, polipeptídeos variantes da presente invenção não ativam complemento ou ativam complemento fracamente. Por exemplo, um polipeptídeo variante manifesta cerca de 0-10% de atividade de CDC neste ensaio comparado com um anticorpo controle tendo uma região Fc de IgG1 não mutada. Preferivelmente a variante não aparenta ter qualquer atividade de CDC (e.g. acima de conhecimento) no ensaio de CDC acima. Em outras formas de realização, um polipeptídeo variante da presente invenção é encontrado tendo CDC realçada comparado com um polipeptídeo originário (e.g., preferivelmente manifestando cerca de 1,1, 1,5, 1,7, ou 2 vezes a cerca de 100 vezes (ou maior) de realçamento em atividade de CDC in vitro ou in vivo quando os valores de IC₅₀ são comparados).

[0136] Polipeptídeos variantes da presente invenção também podem ser

selecionados por depleção de células alvo em um ensaio de todo o sangue. Por exemplo, várias concentrações do polipeptídeo variante com especificidade de alvo CD20 podem ser selecionadas para a depleção de células B em um ensaio de todo o sangue usando facs (Vugmeyster et al., 2003 Cytometry 52A, 101-109). Sangue frescamente contraído é incubado com várias concentrações do polipeptídeo variante a 37 °C e 5,0% de CO₂ por 4 horas (tempo pode ser variado). Seguindo a incubação, células vermelhas de sangue são lisadas por direções de fabricante com um reagente de cloreto de amônio (Beckton-Dickinson cat. #555899) e células B são detectadas por facs usando um anticorpo fluorescente-marcado específico para células B (anti-CD 19, por exemplo). Os resultados põem ser expressos como depleção percentual de células B relativa a ou uma amostra não tratada ou uma amostra incubada com um anticorpo irrelevante (não-redutor).

[0137] Em formas de realização preferidas, um polipeptídeo variante reduz células B mais efetivamente do que o polipeptídeo originário. Um polipeptídeo variante pode reduzir células B, por exemplo, para cerca de 2 vezes ou maior grau do que o polipeptídeo originário, e preferivelmente cerca de 5 vezes ou mais. Também, uma variante pode manifestar maior potência em reduzir células B. Por exemplo, uma variante pode reduzir a mesma porcentagem de células B em relação ao polipeptídeo originário, mas utilizar cerca de 5 vezes menos, e preferivelmente cerca de 10 vezes menos anticorpo. Redução de célula alvo mediada por variantes pode ser cerca de 2 vezes, 3 vezes, 5 vezes a cerca de 1000 vezes ou maior, e preferivelmente de cerca de 5 vezes a cerca de 1000 vezes melhorada comparado com o polipeptídeo originário.

[0138] As variantes da presente invenção também podem ser selecionadas in vivo. Qualquer tipo de ensaio in vivo pode ser empregado. Um exemplo particular de um tipo de ensaio é fornecido abaixo. Este ensaio exemplar permite avaliação pré-clínica de variantes de Fc in vivo. Uma variante a ser testada pode ser incorporada à região Fc de um anticorpo particular conhecido por ter alguma atividade. Por exemplo, uma variante pode ser incorporada à região Fc de uma IgG anti-CD20 por mutagênese. Isto permite que uma IgG originário e IgG de variante de Fc sejam

comparadas diretamente com RITUXAN (conhecido por promover regressão de tumor). A avaliação pré-clínica pode ser feita em 2 fases (uma fase farmacocinética e farmacodinâmica). O objetivo dos estudos farmacocinéticos de Fase I é determinar se existem diferenças na taxa de depuração entre uma IgG de variante de Fc e o anticorpo com conhecida atividade in vivo (e.g., RITUXAN). Diferenças em taxa de depuração podem causar diferenças no nível de estado constante de IgG no soro. Desta forma, se diferenças em concentrações de estado constante são detectadas estas devem ser normalizadas para permitir que comparações acuradas sejam feitas. O objetivo dos estudos farmacodinâmicos de Fase II é determinar o efeito das mutações de Fc sobre, neste caso, crescimento de tumor. Estudos prévios com RITUXAN usaram uma dose única que inibiu completamente crescimento de tumor. Pelo fato disto não permitir que diferenças quantitativas sejam medidas, uma variação de dose deveria ser empregada.

[0139] Pode ser realizada comparação farmacocinética de Fase I de uma variante de Fc, do Fc originário tipo selvagem, e de RITUXAN, e.g., da seguinte maneira. Primeiro, 40 µg (ou outra dose a ser testada) por animal podem ser injetados intravenosamente e o nível de plasma da IgG quantificado em 0, 0,25, 0,5, 1, 24, 48, 72, 96, 120, 168, e 336 hrs. Os dados podem ser ajustados, por exemplo, usando um programa farmacocinético (WinNonLin) usando um modelo farmacocinético de compartimento de zero defasagem dois para obter a taxa de depuração. Taxa de depuração pode ser usada para definir nível de plasma de estado constante com a seguinte equação: $C = \text{Dose}/(\text{Taxa de depuração} \times t)$, onde T é o intervalo entre doses e C é o nível de plasma de estado constante. Experimentos farmacocinéticos podem ser realizados em camundongos transportando não tumor com, por exemplo, um mínimo de 5 camundongos por ponto de tempo.

[0140] Um modelo animal exemplar pode ser empregado para a próxima fase da seguinte maneira. O flanco direito de camundongos CB17-SCID pode ser implantado com 10^6 células Raji subcutaneamente. Injeção intravenosa única do anticorpo de Fc variante, do anticorpo de Fc tipo selvagem, e RITUXAN pode ser iniciada

imediatamente depois de implantação e continuada até que tamanho do tumor seja maior do que 2 cm de diâmetro. Volume de tumor pode ser determinado a cada Segunda-feira, Quarta-feira e Sexta-feira medindo o comprimento, largura, e profundidade do tumor usando um compasso de calibre (volume de tumor = $W \times L \times D$). Uma representação gráfica de volume de tumor verso tempo irá fornecer a taxa de crescimento de tumor para o cálculo farmacodinâmico. Um mínimo de cerca de 10 animais por grupo deve ser usado.

[0141] Pode ser realizada comparação farmacodinâmica de Fase II ao anticorpo de Fc variante, do anticorpo de Fc tipo selvagem, e de RITUXAN, e.g., da seguinte maneira. Baseado em dados publicados, RITUXAN a 10 $\mu\text{g/g}$ semanalmente inibiu completamente crescimento de tumor in vivo (Clynes et al., Nat. Med. 6:443-6, 2000). Portanto, uma variação de dose semanal de 10 $\mu\text{g/g}$, 5 $\mu\text{g/g}$, 1 $\mu\text{g/g}$, 0,5 $\mu\text{g/g}$ e 0 $\mu\text{g/g}$ pode ser testada. O nível de plasma de estado constante no qual taxa de crescimento de tumor é inibida em 50% pode ser graficamente determinado pela relação entre nível de plasma de estado constante e efetividade. O nível de plasma de estado constante pode ser calculado como descrito acima. Se necessário, τ pode ser ajustado por conseguinte para cada anticorpo de Fc variante e o anticorpo de Fc tipo selvagem dependendo de suas propriedades farmacocinéticas para atingir nível de plasma de estado constante comparável com RITUXAN. Valores farmacodinâmicos estatisticamente melhorados do anticorpo de Fc variante em comparação com o polipeptídeo originário (e.g., anticorpo de Fc tipo selvagem) e RITUXAN irá geralmente indicar que o anticorpo de Fc variante confere melhorada atividade in vivo.

[0142] Comparações farmacodinâmicas adicionais de anticorpos de Fc variantes, anticorpos de Fc tipo selvagem, e RITUXAN podem ser realizadas em macacos 'cynomolgous' como descrito previamente (Reff et al., Blood 83, 435-445, 1994). Uma resposta de dose para depleção de células B periféricas e células B de linfonodo pode ser usada para comparar as potências relativas das variantes de Fc com Fc tipo selvagem e RITUXAN administrado intravenosamente e/ou subcutaneamente. Valores farmacodinâmicos estatisticamente melhorados da

variante de Fc em comparação com o polipeptídeo originário (e.g., Fc tipo selvagem) e RITUXAN irá geralmente indicar que o anticorpo de Fc variante confere melhorada atividade in vivo.

[0143] Em formas de realização adicionais, as variantes (i.e., polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção, ou porção funcional deste) da presente invenção são selecionadas de forma que variantes que são úteis para uso terapêutico em pelo menos duas espécies são identificadas. Tais variantes são referidas neste lugar como “variantes melhoradas de espécies duais”, e são particularmente úteis para identificar variantes que são terapêuticas em humanos, e também demonstram (ou são prováveis para demonstrar) eficácia em um modelo animal. Sob esse aspecto, a presente invenção fornece métodos para identificar variantes que têm uma grande chance de serem aprovadas para testagem clínica em humana uma vez que dados de modelo animal irão provavelmente suportar quaisquer aplicações de testagem humano feita para agências reguladoras governamentais (e.g., U.S. Food and Drug Administration).

[0144] Em certas formas de realização, variantes melhoradas de espécies duais são identificadas primeiro pela realização de um ensaio de ADCC usando células efetoras humanas para encontrar variantes melhoradas, e então realizando um segundo ensaio de ADCC usando células efetoras de camundongo, rato, ou primata não humano para identificar um subconjunto das variantes melhoradas que são variantes melhoradas de espécies duais. Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece métodos para identificar variantes melhoradas de espécies duais, compreendendo: a) fornecer: i) células alvo, ii) uma composição compreendendo uma variante candidata de um polipeptídeo originário tendo pelo menos uma porção de uma região Fc, caracterizada pelo fato de que a variante candidata compreende pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc, e caracterizada pelo fato de que a variante candidata media citotoxicidade de célula alvo na presença de células efetoras de uma primeira espécie (e.g., humana) mais efetivamente do que o polipeptídeo originário, e iii) células efetoras de segunda espécie (e.g., camundongo, rato, ou primata não humano), e b) incubar a

composição com as células alvo sob condições de forma que a variante candidata se liga a células alvo por causa disso gerando células alvo ligadas à variante candidata, c) misturar as células efectoras de segunda espécie com as células alvo ligadas à variante candidata, e d) medir citotoxicidade de célula alvo mediada pela variante candidata.

[0145] Em certas formas de realização, o método compreende adicionalmente etapa e) determinar se a variante candidata media citotoxicidade de célula alvo na presença de células efectoras de segunda espécie mais efetivamente do que o polipeptídeo originário. Em algumas formas de realização, o método compreende adicionalmente etapa f) identificar uma variante candidata como uma variante melhorada de espécie dual que media citotoxicidade de célula alvo na presença de células efectoras de segunda espécie mais efetivamente do que o polipeptídeo originário. Em formas de realização preferidas, as variantes de espécies duais identificadas são então selecionadas in vivo em um ou mais ensaios animais.

[0146] Em certas formas de realização, variantes melhoradas de espécies duais são identificadas primeiro pela realização de um ensaio de todo o sangue usando sangue humano para encontrar variantes melhoradas, e então realizando um segundo ensaio de todo o sangue usando sangue de camundongo, rato, ou primata não humano para identificar um subconjunto das variantes melhoradas que são variantes melhoradas de espécies duais. Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece métodos para identificar variantes melhoradas de espécies duais, compreendendo: a) fornecer: i) células alvo, ii) uma composição compreendendo uma variante candidata de um polipeptídeo originário tendo pelo menos uma porção de uma região Fc, caracterizada pelo fato de que a variante candidata compreende pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc, e caracterizada pelo fato de que a variante candidata media depleção de célula alvo na presença de sangue de uma primeira espécie (e.g., humana) mais efetivamente do que o polipeptídeo originário, e iii) sangue de segunda espécie (e.g., camundongo, rato, ou primata não humano), e b) incubar a composição com as células alvo sob condições de forma que a variante candidata se liga a células alvo

por causa disso gerando células alvo ligadas à variante candidata, c) misturar o sangue de segunda espécie com as células alvo ligadas à variante candidata, e d) medir depleção de célula alvo mediada pela variante candidata. Em certas formas de realização, o método compreende adicionalmente etapa e) determinar se a variante candidata media depleção de célula alvo na presença do sangue de segunda espécie mais efetivamente do que o polipeptídeo originário. Em algumas formas de realização, o método compreende adicionalmente etapa f) identificar uma variante candidata como uma variante melhorada de espécie dual que media depleção de célula alvo na presença do sangue de segunda espécie mais efetivamente do que o polipeptídeo originário. Em formas de realização preferidas, as variantes de espécies duais identificadas são então selecionadas in vivo em um ou mais ensaios animais.

[0147] Em certas formas de realização, variantes melhoradas de espécies duais são identificadas realizando qualquer dos ensaios acima usando componentes humano (e.g., células humanas, FcR humano, etc.) para identificar variantes melhoradas, e então correndo o mesmo ensaio (ou um ensaio diferente) com componentes animais não humanos (e.g., células de camundongo, FcR de camundongo, etc.). Sob esse aspecto, um subconjunto de variantes que realizam bem de acordo com um dado critério em ambos os ensaios baseados em humanos e ensaios baseados em segunda espécie pode ser identificado.

[0148] Um processo exemplar para identificar variantes melhoradas de espécies duais é como segue. Primeiro, uma seqüência de ácidos nucleicos codificando pelo menos uma porção de uma região Fc de IgG é mutada de forma que a seqüência de aminoácidos expressa tem pelo menos uma mudança de aminoácido, por causa disso gerando uma variante. Esta variante expressa de IgG é então caracterizada em um ensaio de ADCC usando PBMCs humanos ou um subconjunto (células NK ou macrófagos, por exemplo). Se atividade de ADCC é encontrada realçada, então a variante é selecionada em um segundo ensaio de ADCC usando PBMCs de camundongo ou rato. Alternativamente, ou em adição, um ensaio pode ser realizado com a variante para ligação a receptores ou linhagens celulares de roedores clonados. Finalmente, se a variante é encontrada ser melhorada no segundo ensaio,

a tornando uma variante melhorada dual, então a variante é selecionada in vivo em camundongos ou ratos.

Moléculas Exemplos Contendo Região Fc Variante

[0149] As regiões Fc variantes da presente invenção podem ser parte de moléculas maiores. As moléculas maiores podem ser, por exemplo, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpo biespecíficos, imunoadesinas, etc. Adicionalmente, uma região Fc variante da invenção pode ser operavelmente ligada a um polipeptídeo não anticorpo no o qual ela pode conferir meia vida alterada (aumentada ou diminuída). Desta forma, é evidente que existe uma ampla variação de aplicações para as regiões Fc variantes da presente invenção.

Anticorpos Contendo Regiões Fc Variantes

[0150] Em formas de realização preferidas, a molécula contendo região Fc variante (e.g., polipeptídeo) é um anticorpo. Técnicas para produzir anticorpos são descritas abaixo:

(i) Seleção e preparação de antígeno

[0151] Geralmente, quando a molécula contendo região Fc variante é um anticorpo, o anticorpo é direcionado contra um antígeno de interesse. Preferivelmente, o antígeno é um polipeptídeo e administração do anticorpo para um mamífero sofrendo de uma doença ou desordem que seria beneficiado por uma diminuição na quantidade ou atividade da molécula antigênica pode resultar em um benefício terapêutico neste mamífero. Entretanto, anticorpos direcionados contra antígenos não polipeptídeo (tal como antígenos de glicolípido associados com tumor; veja Patente Norte-Americana No. 5.091.178), também podem ser empregados.

[0152] Antígenos exemplares incluem, mas não são limitados à, moléculas tal como renina; um hormônio de crescimento, incluindo hormônio de crescimento humano e hormônio de crescimento bovino; fator de liberação de hormônio de crescimento; hormônio de paratireóide; hormônio estimulante de tireóide; lipoproteínas, anitripsina-alfa-i; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina;

proinsulina; hormônio estimulante de folículo; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores coagulantes tal como fator VIIIc, fator IX, fator de tecido (TF), e fator de von Willebrands; fatores anticoagulantes tal como Proteína C; fator natriurético atrial; surfactante de pulmão; um ativador de plasminogênio, tal como uroquinase ou urina humana ou ativador de plasminogênio tipo tecido (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose de tumor alfa e beta; encefalinase; RANTES (regulado em ativação de célula-T normalmente expressa e secretada); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); uma albumina de soro tal como albumina de soro humana; substância Muelleriana-inibidora; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; Dnase; IgE; um antígeno citotóxico associado a linfócito-T (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervos; fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto tal como um FGF e FGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF) tal como TGF-alfa e TGF beta, incluindo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4, ou TGF-5; fator de crescimento tipo insulina I e II (IGF-I e IGF-II); dês (1-3)-IGF-I (IGF-I de cérebro); proteínas ligando fator de crescimento tipo insulina; proteínas CD tal como CD3, CD4, CD8, CD19 e CD20; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética de osso (BMP); um fator de diferenciação de crescimento (e.g., GDF8), um interferon tal como interferon-alfa, beta e gama; fatores estimulantes de colônia (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), e.g., IL-1 a IL-25; superóxido dismutase; receptores de célula T-25; proteínas de superfície de membrana, fator acelerador de decaimento; antígeno viral tal como, por exemplo, uma porção do envelope de AIDS; proteínas de transporte; receptores de residência; adressinas; proteínas reguladoras; integrinas tal como CD11a, CD11b, CD11c,

CD18, e ICAM, VLA4 e VCAM; um antígeno associado a tumor tal como receptor de HER2, HER3 ou HER4; grelina; um membro de uma via de apoptose; e fragmentos ou precursores de qualquer dos polipeptídeos acima listados.

[0153] Antígenos preferidos incluem, mas não são limitados à, proteínas CD tal como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 e CD34; membros da família de receptor ErbB tal como o receptor de EGF, receptor de HER2, HER3 ou HER4; moléculas de adesão celular tal como LFA-1, MacI, p 150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha 4/\beta 7$, e integrina $X\alpha/\beta 3$ incluindo ou um 5 ou subunidades deste (e.g., anticorpos anti-CD1a, anti-CD18 ou anti-CD1b); fatores de crescimento tal como VEGF; fator de tecido (TF); interferon-alfa (IFN- α); fatores de diferenciação de crescimento, e.g., GDF8; uma interleucina, tal como IL-9; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor $flk2/flt3$; receptor de obesidade (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C e grelina.

[0154] Antígenos solúveis ou fragmentos destes, opcionalmente conjugados com outras moléculas, podem ser usados como imunógenos para gerar anticorpos. Para moléculas transmembrana tal como receptores, fragmentos destes (e.g., o domínio extracelular de um receptor) podem ser usados como o imunógeno. Alternativamente, células expressando a molécula transmembrana podem ser usadas como o imunógeno. Tais células podem ser derivadas de uma fonte natural (e.g., linhagens de células cancerosas) ou podem ser células que foram transformadas por técnicas recombinantes para expressar a molécula transmembrana. Outros antígenos e formas deste úteis para preparar anticorpos serão aparentes para aqueles na arte.

(ii) Anticorpos Policlonais

[0155] A presente invenção fornece anticorpos policlonais com regiões Fc variantes. Por exemplo, um repertório de imunoglobulina humana contendo regiões constantes de IgG modificadas pode ser transplantado em camundongos imunoglobulina-inativados, resultando em camundongos expressando um repertório de IgG contendo regiões Fc modificadas (veja, e.g., Mendez, MJ et al., *Nature Genetics* 15:146 (1997)). Anticorpos policlonais são preferivelmente criados em animais por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno

relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante com uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada (e.g., hemocianina de caramujo *Megathura crenulata*, albumina de soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja) usando um agente bifuncional ou acilante (e.g., maleimidobenzoil sulfosuccinamida éster para conjugação através de resíduos de cisteína, N-hidroxisuccinamida para conjugação através de resíduos de lisina, glutaraldeído, anidrido succínico, SOCL₂, ou R₁N=C=NR, onde R e R₁ são diferentes grupos alquila.

[0156] Exemplos de um protocolo geral de imunização para um coelho e camundongo são como segue. Animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados combinando, por exemplo, 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (e.g., para um coelho ou camundongo respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês depois os animais são estimulados com 1/5 ou 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a quatorze dias depois os animais são sangrados no soro e ensaiados para título de anticorpo. Animais são estimulados até que título atinja platô. Preferivelmente, o animal é estimulado com um conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um diferente reagente de ligação cruzada. Conjugados também podem ser feitos em cultura de célula recombinante como fusões de proteína. Em adição, agentes agregadores tal como alume são adequadamente usados para realçar a resposta imune.

(iii) Anticorpos Monoclonais

[0157] A presente invenção fornece anticorpos monoclonais com regiões Fc variantes. Anticorpos monoclonais podem ser feitos de diversas maneiras, incluindo usar o método de hibridoma (e.g., como descrito por Kohler et al., *Nature*, 256: 495, 1975), ou por métodos de DNA recombinante (e.g., Patente Norte-Americana No. 4.816.567).

[0158] No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro

apropriado, tal como um hamster ou macaco símio, é imunizado para extrair linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão se ligar especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados in vitro. Linfócitos então são fusionados com células de mieloma usando um agente fusionante adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma. As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células originárias de mieloma não fusionadas. Por exemplo, se as células originárias de mieloma carecem da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente irá incluir hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), cujas substâncias previnem o crescimento de células HGPRT-deficientes.

[0159] Células de mieloma preferidas são aquelas que se fusionam eficientemente, suportam estável alto-nível de produção de anticorpo pelas células produtoras de anticorpos selecionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Dentre estas, linhagens de célula de mieloma preferidas são linhagens murinas de mieloma, tal como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-1 I disponíveis a partir do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia USA, e células SP-2 ou X-63-Ag8-653 disponíveis a partir da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Linhagens de células de mieloma humano e heteromieloma de camundongo-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (e.g., Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)).

[0160] Meio de cultura no qual células de hibridoma estão crescendo é ensaiado para produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação in vitro, tal como RIA ou ELISA. Depois são identificadas células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade

desejada, os clones podem ser subclonados limitando procedimentos de diluição e crescidos por métodos padrão. Meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Em adição, as células de hibridoma podem ser crescidas in vivo como tumores de ascites em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tal como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

[0161] DNA codificando os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (e.g., usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras tal como células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra maneira não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Produção recombinante de anticorpos é descrita em mais detalhe abaixo.

[0162] Em algumas formas de realização, anticorpos ou fragmentos de anticorpo são isolados a partir de bibliotecas de anticorpo de fagos geradas usando as técnicas descritas em, por exemplo, McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicações subseqüentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (extensão nM) por embaralhamento de cadeias (Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992)), assim como infecção combinatória e recombinação in vivo como uma estratégia para construir bibliotecas de fagos muito grandes (e.g., Waterhouse et al, *Nuc. Acids*

Res., 21: 2265-2266 (1993)). Assim, estas técnicas, e técnicas similares, são alternativas viáveis para técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpo monoclonal bem conhecidas na arte para isolamento de anticorpos monoclonais. Também, o DNA pode ser modificado, por exemplo, substituindo a seqüência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e leve humana no lugar das seqüências murinas homólogas (e.g., Patente Norte-Americana No. 4.816.567, e Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA, 81: 6851 (1984)), ou ligando covalentemente à seqüência de codificação de imunoglobulina toda ou parte da seqüência de codificação para um polipeptídeo não imunoglobulina.

[0163] Tipicamente tais polipeptídeos não imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo, ou eles são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo quimérico bivalente compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno diferente.

(iv) Anticorpos humanizados e humanos

[0164] A presente invenção fornece anticorpos humanizados e humanos com Regiões Fc variantes da invenção. Em formas de realização preferidas, um anticorpo humanizado compreende seqüências de aminoácidos de anticorpo humano junto com resíduos de aminoácidos que não são do anticorpo humano. Em algumas formas de realização, as seqüências humanas em um anticorpo humanizado compreendem as regiões de estrutura ("FRs") e as seqüências e resíduos que não são de um anticorpo humano compreendem um ou mais CDRs. É válido observar que FRs e CDRs podem ser definidos baseado em numeração de resíduo de aminoácido nas regiões pesadas e VL. O termo CDR é pretendido para significar os sítios não contíguos de combinação de antígeno encontrados dentro da região variável de ambos os polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Estas regiões foram definidas por Kabat et al. (J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)) e Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); "Kabat", Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); "Chothia" and MacCallum et al (J. Mol. Biol. 262:732-

745 (1996); “MacCallum”, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparado contra cada outro. Contudo, a aplicação de qualquer destas definições, sozinha (por exemplo, a definição de Kabat) ou em combinação (para meio de exemplo apenas, a definição combinada de Kabat e Chothia), para se referir a um CDR de um anticorpo (incluindo um anticorpo humanizado), é pretendida para estar dentro do escopo do termo como definido e usado neste lugar.

[0165] Também, o termo “estrutura” quando usado em referência a uma região variável de anticorpo é pretendido para significar todos os resíduos de aminoácidos fora das regiões de CDR dentro da região variável de um anticorpo. Portanto, uma estrutura de região variável é de entre cerca de 100-120 aminoácidos de comprimento mas é pretendida para se referenciar apenas àqueles aminoácidos fora dos CDRs. O termo “região de estrutura” é pretendido para significar cada domínio da estrutura que é separado pelos CDRs. Portanto, para o exemplo específico de uma região VH e para os CDRs como definido por Kabat, região de estrutura 1 (FRI) corresponde a um domínio da região variável abrangendo aminoácidos 1-30; região de estrutura 2 (FR2) corresponde ao domínio da região variável abrangendo aminoácidos 36-49; região 3 (FR3) corresponde ao domínio da região variável abrangendo aminoácidos 66-94; e região 4 (FR4) corresponde ao domínio da região variável a partir do aminoácido 103 até o final da região variável. Os FRs para a cadeia leve são similarmente separados por cada um dos CDRs de região variável de cadeia leve. Similarmente, usando a definição de CDRs por Chothia ou MacCullam, ou qualquer combinação de definições de CDR, os limites de estrutura são separados pelos términos de CDR respectivo como descrito acima. Sem prejuízo do disposto, as múltiplas definições de CDRs, em algumas formas de realização é preferido usar a definição de Kabat a definir CDRs.

[0166] Os resíduos em um anticorpo humanizado que não são de um anticorpo humano podem ser resíduos ou seqüências importados de ou derivados de outras espécies (incluindo mas não limitadas a camundongo), ou estas seqüências podem ser seqüências de aminoácidos aleatórias (e.g., geradas a partir de seqüências de

ácidos nucleicos aleatorizadas), que são inseridas na seqüência de anticorpo humanizado. Como observado acima, as seqüências humanas de aminoácidos em um anticorpo humanizado são preferivelmente os FRs, enquanto os resíduos que não são de um anticorpo humano (quer derivado de outra espécie ou seqüências de aminoácidos aleatórias) preferivelmente correspondem aos CDRs. Entretanto, em algumas formas de realização, um ou mais FRs podem conter um ou mais resíduos de aminoácidos não humanos. Em casos de alterações ou modificações (e.g., por introdução de um resíduo não humano) para estrutura de outra maneira humana, é possível para a FR alterada ou modificada ser adjacente a um CDR modificado de outra espécie ou uma seqüência de CDR aleatória, enquanto em outras formas de realização, uma FR alterada não é adjacente a uma seqüência de CDR alterada de outra espécie ou uma seqüência de CDR aleatória. Em algumas formas de realização, as seqüências de estrutura de um anticorpo humanizado são inteiramente humanas (i.e., nenhuma mudança de estrutura é feita à estrutura humana). Em formas de realização preferidas, as seqüências de estrutura de um anticorpo humanizado são inteiramente de linhagem germinativa humana (i.e., nenhuma mudança de estrutura é feita à estrutura de linhagem germinativa humana).

[0167] Resíduos de aminoácidos não humanos de outra espécie, ou uma seqüência aleatória, são freqüentemente referidos como resíduos “importados”, que são tipicamente tiradas de um domínio variável “importado”. Humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e co-autores (e.g., Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), substituindo CDRs ou seqüências de CDR de roedor (ou outro mamífero) pelas seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Também, anticorpos caracterizados pelo fato de que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana também podem ser gerados (e.g., Patente Norte-Americana No. 4.816.567). Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos no quais alguns

resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores, ou, como observado acima, nos quais seqüências de CDR foram substituídas por seqüências aleatórias. De maneira a não limitar exemplo apenas, métodos para conferir afinidade de ligação de CDR doador em uma estrutura de região variável destinatária de anticorpo são descritos em WO 01/27160 A1, e em pedidos de patente Norte-Americana números de série 09/434.870 e 09/982.464.

[0168] A escolha de domínios variáveis humanos, ambos os leves e pesados, a serem usados para fazer os anticorpos humanizados é importante para reduzir antigenicidade. De acordo com o assim chamada método “de melhor ajuste”, a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor a ser humanizado é selecionada contra a biblioteca inteira de seqüências humanas de domínio variável conhecidas. A seqüência humana que é mais próxima daquela do roedor é então aceita como a estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (e.g., Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993), e Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Outro método usa uma estrutura particular derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para diversos anticorpos humanizados diferentes (e.g., Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0169] Em outras formas de realização, não existe nenhuma necessidade de pré-selecionar uma estrutura particular de anticorpo humano (i.e., não existe nenhuma necessidade de selecionar uma estrutura humana com a mais próxima homologia ou identidade de seqüência com um dado anticorpo candidato a ser humanizado). Nestas formas de realização, uma estrutura humana comum ou universal pode ser usada para aceitar um ou mais CDRs não humanos. Na forma de realização preferida, uma estrutura única universal completamente humana é usada como a estrutura para todos os anticorpos a serem humanizados, independente de sua homologia com a(s) seqüência(s) de estrutura(s) dos anticorpos candidatos. Sob esse aspecto, anticorpos humanizados podem ser gerados sem fazer quaisquer

mudanças na região de estrutura. Esta estrutura universal completamente humana pode então aceitar uma ou mais seqüências de CDR. Em uma forma de realização, a uma ou mais seqüências de CDR são seqüências de CDR de um anticorpo de outra espécie (e.g., camundongo ou rato) que foram modificadas em comparação com o CDR correspondente no anticorpo intacto da outra espécie (i.e. existe simultânea introdução do CDR e modificação do CDR sendo introduzido na estrutura universal humana). A modificação corresponde a uma ou mais mudanças de aminoácidos (no CDR modificado) em comparação com o CDR correspondente no anticorpo intacto de outra espécie. Em uma forma de realização, todos os resíduos de aminoácidos no CDR são incluídos em uma biblioteca, enquanto em outras formas de realização, nem todos os resíduos de aminoácidos no CDR são incluídos em uma biblioteca. Em outra forma de realização, a uma ou mais seqüências de CDR são seqüências aleatórias, que substituem seqüências de CDR.

[0170] Em formas de realização preferidas, anticorpos são humanizados com retenção de alta afinidade pelo antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Em algumas formas de realização, a afinidade do anticorpo humanizado pelo antígeno é superior do que a afinidade do anticorpo não humanizado correspondente ou fragmento ou porção deste (e.g., o anticorpo candidato de roedor). Sob esse aspecto, em algumas formas de realização, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das seqüências originárias e vários produtos humanizados conceituais, usando modelos tridimensionais das seqüências originárias e humanizada. Modelos tridimensionais de imunoglobulinas são comumente disponíveis e são familiares para aqueles versados na arte. São disponíveis programas de computador que ilustram e manifestam prováveis estruturas tridimensionais conformacionais de seqüências de imunoglobulinas candidatas selecionadas. Inspeção destas manifestações permite análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da seqüência de imunoglobulina candidata, i.e., a análise de resíduos que influenciam a habilidade da imunoglobulina candidata para se ligar a seu antígeno. Desta maneira, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências destinatária e

importada de forma que a característica desejada de anticorpo, tal como aumentada afinidade pelo(s) antígeno(s) alvo, é atingida. Em geral, os resíduos de CDR são diretamente e mais substancialmente envolvidos em influenciar ligação de antígeno.

[0171] Uma variedade de métodos específicos, bem conhecidos por um de verso na arte, pode ser empregada para introduzir CDRs de anticorpo (ou seqüências aleatórias substituindo CDRs de anticorpo) em estruturas de anticorpo (veja, por exemplo, pedidos de Patente Norte-Americana 09/434.879 e 09/982.464). Em algumas formas de realização, oligos sobrepostos podem ser usados para sintetizar um gene de anticorpo, ou porção deste (por exemplo, um gene codificando um anticorpo humanizado). Em outras formas de realização, mutagênese de um modelo de anticorpo pode ser realizada usando os métodos de Kunkel (abaixo), por exemplo para introduzir um CDR modificado ou uma seqüência aleatória para substituir um CDR. Em algumas formas de realização, regiões variáveis de cadeia leve e pesada são humanizadas separadamente, e então co-expressas como uma região variável humanizada. Em outras formas de realização, regiões variáveis humanizadas fazem a região variável de um anticorpo intacto. Em algumas formas de realização, a região Fc do anticorpo intacto compreendendo uma região variável humanizada foi modificada (e.g. pelo menos uma modificação de aminoácido foi feita na região Fc). Por exemplo, um anticorpo que foi humanizado com CDR aleatorizado e nenhuma mudança de estrutura pode compreender pelo menos uma modificação de aminoácido na região Fc.

[0172] Em outra forma de realização, são empregados animais transgênicos (e.g., camundongos) que são capazes, com imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulina. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota de gene da região de união de cadeia pesada de anticorpo (JH) em camundongos mutantes quiméricos e de linhagem germinativa resulta em inibição completa de produção endógena de anticorpo. Transferência do conjunto de gene de imunoglobulina de linhagem germinativa humana em tais camundongos mutantes de linhagem germinativa irá resultar na produção de anticorpos humanos sobre desafio de

antígeno (Veja, e.g., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993), e Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993)). Anticorpos humanos também podem ser derivados de bibliotecas de manifestação de fago (e.g., Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991), e Vaughan et al., Nature Biotech 14: 309 (1996)).

[0173] A presente invenção fornece métodos para gerar anticorpos humanizados (e fragmentos de anticorpo) que compreendem pelo menos uma substituição de aminoácido como listado na Tabela 1 neste lugar, na região Fc (quando comparado a um polipeptídeo originário compreendendo uma região Fc sem a substituição de aminoácido). São discutidos abaixo métodos adicionais para gerar tais anticorpos humanizados. A presente invenção também fornece composições compreendendo os anticorpos e fragmentos de anticorpo gerados por este método. Importaneamente, os métodos de humanização discutidos abaixo, e outros métodos de humanização (e.g., discutidos acima), podem ser combinados com as regiões Fc variantes da presente invenção. Sob esse aspecto, anticorpos humanizados com regiões Fc únicas alteradas podem ser construídos de acordo com a presente invenção.

[0174] Em algumas formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é fornecido, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar primeiros oligonucleotídeos codificando porções dos FRs da região VH doadora, caracterizados pelo fato de que as porções dos FRs quando comparadas com a segunda seqüência de referência não são modificadas; e uma população de segundos oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificada, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de HCDR1, HCDR2 e HCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando

comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; c) misturar os primeiros oligonucleotídeos com a população de segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VH alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0175] Em outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é fornecido, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar primeiros oligonucleotídeos codificando porções dos FRs da região VH doadora, caracterizados pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a segunda seqüência de referência não são modificadas; e uma população de segundos oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificada, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de LCDR1, LCDR2 e LCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; c) misturar os primeiros oligonucleotídeos com a população de segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos

nucleicos codificando região VL alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0176] Em algumas formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é contemplado, compreendendo: A) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; B) sintetizar uma população de primeiros oligonucleotídeos, cada codificando pelo menos uma porção de um primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de HCDR1, HCDR2 e HCDR3, caracterizada pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência; e segundos oligonucleotídeos codificando i) porções das FRs da região VH destinatária, caracterizadas pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a seqüência de referência não são modificadas e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; C) misturar a população de primeiros oligonucleotídeos com os segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e D) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VH alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0177] Em outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é fornecido, compreendendo: A) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três

CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; B) sintetizar a) uma população de primeiros oligonucleotídeos, cada codificando pelo menos uma porção de um primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de LCDR1, LCDR2 e LCDR3, caracterizada pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência; e b) segundos oligonucleotídeos codificando i) porções das FRs da região VL destinatária, caracterizadas pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a seqüência de referência não são modificadas e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; C) misturar a população de primeiros oligonucleotídeos com os segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e D) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VL alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0178] Em algumas formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em algumas formas de realização, o método adicionalmente compreende a etapa de (e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada com um ácido nucleico codificando região variável de cadeia leve de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em algumas formas de realização, a síntetização compreende sintetizar quimicamente. Em algumas formas de realização, o destinatário é humano. Em algumas formas de realização, o tratamento de etapa (d) compreende extensão por uma polimerase.

[0179] Em outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de

uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs, a segunda seqüência de referência compreendendo uma região VH; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VH alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VH alteradas são idênticas às FRs da segunda seqüência de referência e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas foi modificado, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com o CDR doador correspondente da primeira seqüência de referência.

[0180] Em algumas formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VL alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VL alteradas são idênticas às FRs da segunda seqüência de referência e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas foi modificado, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com o CDR doador correspondente da primeira seqüência de referência.

[0181] Em algumas formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em algumas formas de realização, o método adicionalmente compreende a etapa de co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada com um ácido nucleico codificando região VH de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em algumas formas de realização, o destinatário é humano. Em algumas formas de realização, a sintetização envolve o

uso de oligonucleotídeos sobrepostos.

[0182] Em ainda outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de uma seqüência de aminoácidos de referência, a seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora compreendendo FRs; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VH alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VH alteradas são idênticas a FRs da seqüência de referência e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas compreende uma seqüência de aminoácidos aleatória.

[0183] Em outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de uma seqüência de aminoácidos de referência, a seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora compreendendo FRs; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VL alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VL alteradas são idênticas a FRs da seqüência de referência e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas compreende uma seqüência de aminoácidos aleatória.

[0184] Em ainda outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de uma seqüência de aminoácidos de referência, a seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora humana compreendendo FRs; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VH alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VH alteradas são idênticas a FRs da seqüência de referência humana e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas compreende uma seqüência de aminoácidos aleatória. Em algumas formas de realização, a representação da seqüência de referência humana é em forma eletrônica.

[0185] Em outras formas de realização, um método de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é contemplado, compreendendo: a) fornecer uma representação de uma seqüência de aminoácidos de referência, a seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora humana compreendendo FRs; b) sintetizar uma população de seqüências de genes de anticorpo de região VL alterada, caracterizada pelo fato de que as FRs das regiões VL alteradas são idênticas a FRs da seqüência de referência humana e pelo menos um primeiro CDR das regiões variáveis de anticorpo alteradas compreende uma seqüência de aminoácidos aleatória.

[0186] Em algumas formas de realização, a representação da seqüência de referência é em forma eletrônica. Em algumas formas de realização, o método adicionalmente compreende a etapa de co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada com um ácido nucleico codificando região VH de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em algumas formas de realização, o destinatário é humano. Em algumas formas de realização, a síntetização envolve o uso de oligonucleotídeos sobrepostos. Em algumas formas de realização, os CDRs são definidos pela definição de Kabat.

[0187] Em algumas formas de realização, uma ou mais FRs são modificadas simultaneamente com a introdução de uma ou mais CDRs modificadas. Em outras formas de realização, as estruturas modificadas são adjacentes aos CDRs modificados.

[0188] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária

compreendendo FRs; b) sintetizar a) uma primeira população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando uma FR da região VH modificada, ou porção desta, caracterizada pelo fato de que a FR da região VH modificada, ou porção desta, contém uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e b) uma segunda população de oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado, ou porção deste, compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e ii) uma ou mais porções de FRs adjacentes que são capazes de hibridizar com a primeira população de oligonucleotídeos; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída. Em certas formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em outras formas de realização, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de (e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada com um ácido nucleico codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em formas de realização adicionais, a síntese compreende sintetizar quimicamente. Em algumas formas de realização, o destinatário é humano. Em formas de realização preferidas, uma ou mais da população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas são parte de um anticorpo compreendendo uma região Fc, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende pelo menos uma substituição de aminoácido quando comparado a um polipeptídeo originário tendo uma região Fc.

[0189] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar a) uma primeira população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando uma FR da região VL modificada, ou porção desta, caracterizada pelo fato de que a FR da região VL modificada, ou porção desta, contém uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e b) uma segunda população de oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado, ou porção deste, compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e ii) uma ou mais porções de FRs adjacentes que são capazes de hibridizar com a primeira população de oligonucleotídeos; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída. Em outras formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em formas de realização adicionais, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de (e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada com um ácido nucleico codificando região variável de

cadeia leve de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas.

[0190] Em algumas formas de realização, os métodos compreendem: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar a) uma primeira população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando uma FR da região VH modificada, ou porção desta, caracterizada pelo fato de que a FR da região VH modificada, ou porção desta, contém uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e b) uma segunda população de oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado, ou porção deste, compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e ii) uma ou mais porções de FRs adjacentes que são capazes de hibridizar com a primeira população de oligonucleotídeos; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) estender os oligonucleotídeos sobrepostos com uma DNA polimerase sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída.

[0191] Em ainda outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas

seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar a) uma primeira população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando uma FR da região VL modificada, ou porção desta, caracterizada pelo fato de que a FR da região VL modificada, ou porção desta, contém uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e b) uma segunda população de oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado, ou porção deste, compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e ii) uma ou mais porções de FRs adjacentes que são capazes de hibridizar com a primeira população de oligonucleotídeos; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) estender os oligonucleotídeos sobrepostos com uma DNA polimerase sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída.

[0192] Em algumas formas de realização, uma ou mais modificações são introduzidas na estrutura, simultaneamente com a introdução de um ou mais CDRs modificados. Os CDRs modificados podem compreender uma ou mais alterações de aminoácidos em comparação com o CDR correspondente de uma seqüência de referência. Em certas formas de realização, os métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada, compreendem: a) fornecer uma

representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar i) uma primeira população de oligonucleotídeos, cada compreendendo pelo menos um CDR modificado, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente; e ii) uma segunda população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando porções modificadas de uma estrutura de região VH, a porção modificada contendo uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos sob condições tal que pelo menos uma porção dos oligonucleotídeos hibridiza de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída. Em certas formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em formas de realização adicionais, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de (e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada com um ácido nucleico codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em outras formas de realização, o destinatário é humano.

[0193] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada,

compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar i) uma primeira população de oligonucleotídeos, cada compreendendo pelo menos um CDR modificado, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente; e ii) uma segunda população de oligonucleotídeos, compreendendo oligonucleotídeos codificando porções modificadas de uma estrutura de região VL, a porção modificada contendo uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de região de estrutura destinatária, caracterizados pelo fato de que as posições de estrutura que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e c) misturar as primeiras e segundas populações de oligonucleotídeos sob condições tal que pelo menos uma porção dos oligonucleotídeos hibridiza de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída.

[0194] Em certas formas de realização, podem ser gerados os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendendo uma variante de Fc e uma região variante de cadeia pesada alterada. Por exemplo, em algumas formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a

região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; B) sintetizar A) primeiros oligonucleotídeos codificando porções das FRs da região VH destinatária, caracterizadas pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a seqüência de referência não são modificadas; e B) uma população de segundos oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificado, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de HCDR1, HCDR2 e HCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; c) misturar os primeiros oligonucleotídeos com uma população de segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VH alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência. Em algumas formas de realização, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada com um ácido nucleico codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas.

[0195] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a

seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; b) sintetizar a) primeiros oligonucleotídeos codificando porções dos FRs da região VL doadora, caracterizados pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a segunda seqüência de referência não são modificadas; e b) uma população de segundos oligonucleotídeos, cada codificando i) pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificada, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de LCDR1, LCDR2 e LCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência e ii) uma ou mais porções de FRs não modificadas que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; c) misturar os primeiros oligonucleotídeos com a população de segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VL alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0196] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada, compreendendo: A) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo FRs; B) sintetizar a) uma população de primeiros oligonucleotídeos cada codificando i) pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificado, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de HCDR1, HCDR2 e HCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira

seqüência de referência; e b) segundos oligonucleotídeos codificando i) porções das FRs da região VH destinatária, caracterizadas pelo fato de que as porções das FRs quando comparadas com a seqüência de referência não são modificadas e ii) uma ou mais porções de um CDR que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; C) misturar a população de primeiros oligonucleotídeos com os segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VH alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0197] Em certas formas de realização, os métodos compreendem adicionalmente a etapa de co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada com um ácido nucleico codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas.

[0198] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada, compreendendo: A) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de referência compreendendo a seqüência de uma região VL destinatária compreendendo FRs; B) sintetizar a) uma população de primeiros oligonucleotídeos, cada codificando pelo menos uma porção de um primeiro CDR que foi modificado, o primeiro CDR selecionado do grupo consistindo de LCDR1, LCDR2 e LCDR3, caracterizado pelo fato de que o primeiro CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com os CDRs doadores correspondentes da primeira seqüência de referência; e b) segundos oligonucleotídeos codificando i) porções das FRs da região VL destinatária, caracterizadas pelo fato de que as porções das FRs quando

comparadas com a seqüência de referência não são modificadas e ii) uma ou mais porções de um CDR que são capazes de hibridizar com os primeiros oligonucleotídeos; C) misturar a população de primeiros oligonucleotídeos com os segundos oligonucleotídeos de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e D) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é construída, caracterizada pelo fato de que as FRs codificadas pelos ácidos nucleicos codificando região VL alterada não são modificadas com respeito à segunda seqüência de referência.

[0199] Em outras formas de realização, a presente invenção fornece métodos de melhorar a afinidade de ligação de uma região variável mutada de anticorpo humanizado, compreendendo: a) fornecer uma seqüência de ácidos nucleicos codificando uma primeira região variável mutada de anticorpo humanizado, a região variável mutada compreendendo (i) uma estrutura de anticorpo humano tipo selvagem, (ii) três CDRs de cadeia pesada não humanos, e (iii) três CDRs de cadeia leve não humanos, caracterizada pelo fato de que os CDRs são definidos pelas definições combinadas de Kabat e Chothia, caracterizados pelo fato de que pelo menos um dos CDRs de cadeia leve é um CDR de cadeia leve contendo mutação pelo menos um aminoácido diferente em pelo menos uma posição quando comparado com o CDR não humano tipo selvagem correspondente, e caracterizada pelo fato de que a primeira região variável mutada de anticorpo tem uma afinidade de ligação maior do que a região variável de anticorpo não mutada correspondente; b) mutar a seqüência de ácidos nucleicos codificando a primeira região variável mutada de anticorpo sob condições tal que uma segunda região variável mutada de anticorpo humanizado é codificada, a segunda região variável mutada de anticorpo humanizado compreendendo pelo menos um aminoácido diferente adicional em pelo menos uma posição no CDR de cadeia leve contendo mutação, a mutação adicional em combinação com a primeira mutação resultando em maior afinidade de ligação. Em algumas formas de realização, o CDR de cadeia leve contendo mutação da primeira região variável mutada de anticorpo humanizado é CDR3 (LCDR3).

[0200] Em outras formas de realização, pelo menos um dos CDRs de cadeia

pesada da primeira região variável mutada de anticorpo humanizado compreende uma mutação, tal que um aminoácido diferente é codificado em pelo menos uma posição quando comparado com o CDR não humano tipo selvagem correspondente. Em formas de realização adicionais, a mutação de CDR de cadeia pesada é em HCDR3.

[0201] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece métodos de simultaneamente modificar pelo menos um CDR e pelo menos uma FR enquanto construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada, compreendendo: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH doadora, a região variável doadora compreendendo i) quatro FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VH destinatária compreendendo quatro FRs; b) sintetizar i) para cada FR a ser modificada, uma população de oligonucleotídeos, cada codificando uma FR modificada, ou porção desta, a FR modificada ou porção desta, contendo uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a região de estrutura correspondente na seqüência de referência de região VH destinatária, caracterizadas pelo fato de que as posições de FR que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de região de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e ii) para cada CDR a ser modificado, uma população de oligonucleotídeos, cada codificando um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e iii) para cada de quaisquer FRs remanescentes e não modificadas, oligonucleotídeos codificando a FR, ou porção desta, tendo a mesma seqüência da FR correspondente da segunda seqüência destinatária de referência; e iv) para cada de quaisquer

CDRs remanescentes e não modificados, oligonucleotídeos codificando o CDR, ou porção deste, tendo a mesma seqüência do CDR correspondente da primeira seqüência doadora de referência, caracterizados pelo fato de que oligonucleotídeos individuais de (i) até (iv) que codificam porções adjacentes da região VH têm seqüências sobrepostas em seus terminos; e c) misturar os oligonucleotídeos e populações de oligonucleotídeos sintetizados em etapa b) sob condições tal que as seqüências sobrepostas de oligonucleotídeos individuais hibridizem de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VH alterada é formada. Em certas formas de realização, a representação de primeiras e segundas seqüências de referência é em forma eletrônica. Em formas de realização adicionais, a região de estrutura a ser modificada é selecionada do grupo consistindo de HCDR1, HCDR2 e HCDR3. Em outras formas de realização, o CDR a ser modificado é HCDR3. Em outras formas de realização, o método compreende adicionalmente a etapa de e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH com um ácido nucleico codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas. Em diferentes formas de realização, o método compreende adicionalmente a etapa de e) co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VH com uma população de ácidos nucleicos codificando região VL de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas.

[0202] Em outras formas de realização, são empregados os métodos de simultaneamente modificar pelo menos um CDR e pelo menos uma FR enquanto construir uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada, caracterizados pelo fato de que dito método compreende: a) fornecer uma representação de primeiras e segundas seqüências de aminoácidos de referência, a primeira seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de uma região VL doadora, a região variável doadora compreendendo i) quatro FRs e ii) três CDRs como definido pelas definições combinadas de Kabat e Chothia; a segunda seqüência de aminoácidos de referência compreendendo a seqüência de

uma região VL destinatária compreendendo quatro FRs; b) sintetizar i) para cada FR a ser modificada, uma população de oligonucleotídeos, cada codificando uma FR modificada, ou porção desta, a FR modificada ou porção desta, contendo uma pluralidade de aminoácidos trocados em uma ou mais posições quando comparado com a região de estrutura correspondente na seqüência de referência de região VL destinatária, caracterizadas pelo fato de que as posições de FR que são trocadas são selecionadas dentre as posições de estrutura destinatária da segunda seqüência de referência que diferem na posição correspondente comparado com as posições de região de estrutura doadora da primeira seqüência de referência; e ii) para cada CDR a ser modificado, uma população de oligonucleotídeos, cada codificando um CDR modificado, ou porção deste, caracterizado pelo fato de que o CDR modificado compreende um aminoácido diferente em uma ou mais posições quando comparado com a seqüência de referência de aminoácidos de CDR doador correspondente e iii) para cada de quaisquer FRs remanescentes e não modificadas, oligonucleotídeos codificando a FR, ou porção desta, tendo a mesma seqüência da FR correspondente da segunda seqüência destinatária de referência; e iv) para cada de quaisquer CDRs remanescentes e não modificados, oligonucleotídeos codificando o CDR, ou porção deste, tendo a mesma seqüência do CDR correspondente da primeira seqüência doadora de referência, caracterizados pelo fato de que, oligonucleotídeos individuais de (i) até (iv) que codificam porções adjacentes da região VL têm seqüências sobrepostas em seus terminos; e c) misturar os oligonucleotídeos e populações de oligonucleotídeos sintetizados em etapa b) sob condições tal que as seqüências sobrepostas de oligonucleotídeos individuais hibridizem de forma a criar oligonucleotídeos sobrepostos; e d) tratar os oligonucleotídeos sobrepostos sob condições tal que uma população de ácidos nucleicos codificando região VL alterada é formada. Em certas formas de realização, o método compreende adicionalmente a etapa de co-expressar a população de ácidos nucleicos codificando região VL com uma população de ácidos nucleicos codificando região VH de forma a produzir uma população diversa de regiões variáveis heteroméricas alteradas.

(V) Anticorpos multiespecíficos

[0203] A presente invenção fornece anticorpos multiespecíficos compreendendo uma região Fc variante. Anticorpos multiespecíficos têm especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Enquanto tais moléculas normalmente irão se ligar a apenas dois antígenos (i.e., anticorpos biespecíficos, BsAbs), anticorpos com especificidades adicionais tal como anticorpos triespecíficos são abrangidos por esta expressão quando usada neste lugar. Exemplos de BsAbs incluem, mas não são limitados a, aqueles com um braço direcionado contra um antígeno de célula de tumor e o outro braço direcionado contra uma molécula que desencadeia citotoxicidade tal como anti-FcγRI/anti-CD 15, anti-pl 85HER2/FcγRIII (CD 16), anti-CD3/anti- malignidade de célula B (D100), anti-CD3/antipl 85HER2, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de célula renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D I (anti-carcinoma de colo), anti-CD3/anti-análogo de hormônio estimulante de melanócito, anti receptor de EFG/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMAI, anti-CD3/anti-CD 19, anti-CD3/Mo V 18, anti-molécula de adesão de célula neural (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de ligação de folato (FBP)/anti-CD3, antígeno associado a anti-carcinoma pan (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs com um braço que se liga especificamente a um antígeno de tumor e um braço que se liga especificamente a uma toxina tal como anti-saporina/anti-id-1, antiCD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-ricina A, anti-interferon-α (IFN-α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcalóide vinca; BsAbs para converter pró-fármacos ativados por enzima tal como anti-CD30/anti-fosfatase alcalina (que catalisa conversão de pró-fármaco de fosfato de mitocina para álcool de mitocina); BsAbs que podem ser usados como agentes fibrinolíticos tal como anti-fibrina/anti-ativador de plasminogênio de tecido (tPA), anti-fibrina/anti-ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA); BsAbs para direcionar complexos imunes para receptores de superfície celular tal como anti-lipoproteína de baixa densidade (LDL)/anti-FcR (e.g., FcγRI, FcγRII ou FcγRIII); BsAbs para uso em terapia de doenças infecciosas tal como anti-CD3/anti-vírus de herpes simplex, anti-complexo receptor de célula T: CD3/anti-influenza, anti-FcγR/anti-HIV; BsAbs para

detecção de tumor in vitro ou in vivo tal como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185HER2/anti-hapteno; BsAbs como adjuvantes de vacina; BsAbs como ferramentas de diagnóstico tal como anti-IgG de coelho/anti-ferritina, anti-peroxidase de rábano (HRP)/anti-hormônio, anti-somatostatina/anti-substância P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-p-galactosidase.

[0204] Exemplos de anticorpos trispecíficos incluem, mas não são limitados a, anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 e anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpos (e.g., anticorpos biespecíficos de $F(ab')_2$). Métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na arte. Produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento completo é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm diferentes especificidades (e.g., Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Por causa do agrupamento aleatório de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez diferentes moléculas de anticorpo, das quais apenas uma tem a correta estrutura biespecífica. Purificação da molécula correta pode ser realizada por etapas de cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são descritos em WO 93/08829, e Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

[0205] Em outras formas de realização, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação anticorpo-antígeno) são fusionados a seqüências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é preferivelmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2, e CH3. É preferido ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs codificando as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isto sustenta grande flexibilidade ao ajustar as proporções mutuais dos três fragmentos de polipeptídeo

em formas de realização quando proporções desiguais das três cadeias de polipeptídeo usadas na construção fornecem rendimentos ótimos. É, entretanto, possível inserir as seqüências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeo em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeo em iguais proporções resulta em altos rendimentos ou quando as proporções não são de nenhuma significância particular. Em uma forma de realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada híbrida de imunoglobulina com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par híbrido de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina (fornecendo uma segunda especificidade de ligação) no outro braço (veja, e.g., WO 94/04690). De acordo com outra abordagem descrita em WO96/27011 a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser engenheirada para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados de cultura celular recombinante. Anticorpos específicos também incluem anticorpos ligados cruzados ou "heteroconjugado". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina.

B. Moléculas de Imunoadesina

[0206] A presente invenção também fornece moléculas de imunoadesina compreendendo uma região Fc variante. Um tipo de projeto de imunoadesina combina o(s) domínio(s) de ligação da adesina (e.g., o domínio extracelular (ECD) de um receptor) com a região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina (e.g., uma região Fc variante). Habitualmente, ao preparar as imunoadesinas da presente invenção, ácido nucleico codificando o domínio de ligação da adesina será fusionado C-terminalmente ao ácido nucleico codificando o término N de uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina, entretanto fusões N-terminais também são possíveis.

[0207] Tipicamente, em tais fusões o polipeptídeo quimérico codificado irá reter pelo menos funcionalmente ativos dobradiça, domínios CH2 e CH3 da região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Fusões também são feitas ao término C da região Fc de um domínio constante, ou imediatamente N-terminais ao

CH1 da cadeia pesada ou à região correspondente da cadeia leve. O sítio preciso no qual a fusão é feita não é crítico; sítios particulares são bem conhecidos e podem ser selecionados a fim de otimizar a atividade biológica, secreção, ou características de ligação da imunoadesina.

[0208] Em algumas formas de realização, a seqüência de adesina é fusionada ao término N da região Fc variante de imunoglobulina G1. É possível fusionar a região constante de cadeia pesada inteira à seqüência de adesina. Entretanto, em formas de realização preferidas, é usada na fusão uma seqüência começando na região de dobradiça justo acima do sítio de clivagem de papaína que define Fc de IgG quimicamente (i.e., resíduo 216, tomando o primeiro resíduo de região constante de cadeia pesada como sendo 114), ou sítios análogos de outras imunoglobulinas. Em certas formas de realização preferidas, a seqüência de aminoácidos de adesina é fusionada (a) à região de dobradiça e CH2 e CH3 ou (b) à CH1, dobradiça, domínios CH2 e CH3, de uma cadeia pesada de IgG. Em algumas formas de realização, as imunoadesinas são biespecíficas. Alternativamente, as seqüências de adesina podem ser inseridas entre seqüências de cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulina, tal que uma imunoglobulina compreendendo uma cadeia pesada quimérica é obtida. Em tais formas de realização, as seqüências de adesina podem ser fusionadas à extremidade 3' de uma cadeia pesada de imunoglobulina em cada braço de uma imunoglobulina, ou entre a dobradiça e o domínio CH2, ou entre os domínios CH2 e CH3 (veja, e.g., Hoogenboom et al., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991)).

[0209] Embora a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina não seja requerida nas imunoadesinas da presente invenção, uma cadeia leve de imunoglobulina pode estar presente ou covalentemente associada a um polipeptídeo de fusão de adesina-cadeia pesada de imunoglobulina, ou diretamente fusionada a adesina. No caso anterior, DNA codificando uma cadeia leve de imunoglobulina é tipicamente co-expresso com o DNA codificando a proteína de fusão de adesina-cadeia pesada de imunoglobulina. Em secreção, uma cadeia pesada híbrida e a cadeia leve irão ser covalentemente associadas para fornecer uma estrutura tipo

imunoglobulina compreendendo dois pares dissulfeto-ligados de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina. Métodos adequados para a preparação de tais estruturas são, por exemplo, descritos em Patente Norte-Americana No. 4.816.567.

[0210] Em formas de realização preferidas, imunoadesinas são construídas fusionando a seqüência de cDNA codificando a porção de adesina em quadro com uma seqüência de cDNA de imunoglobulina. Entretanto, fusão a fragmentos de imunoglobulina genômica também pode ser usada. Geralmente, o último tipo de fusão requer a presença de seqüências reguladoras de Ig para expressão. CDNAs codificando regiões constantes de cadeia pesada de IgG podem ser isolados baseado em seqüências publicadas de bibliotecas de cDNA derivadas de baço ou linfócitos de sangue periférico, por hibridização ou por técnicas de PCR. Os cDNA s codificando a “adesina” e as partes de imunoglobulina da imunoadesina podem ser inseridos sequencialmente em um vetor plasmídeo que direciona expressão eficiente nas células hospedeiras escolhidas.

Meia Vida Alterada de Polipetídeos Variantes

[0211] O receptor de Fc neonatal “FcRn” é um homólogo de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que não apenas entrega IgGs através da barreira materno-fetal durante gestação, mas também é envolvido na regulação de meia vida no soro de IgG. Para uma recente revisão de FcRn veja Ghetie, V and E.S. Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000. FcRn se liga de uma maneira pH dependente com ligação ocorrendo em pHs levemente ácidos e pouca ou nenhuma ligação detectável em pH 7,4. É postulado que IgGs são absorvidas por células expressando FcRn e entram endossomos ácidos onde a interação FcRn-IgG ocorre. Então as IgGs são transportadas para a superfície celular e liberadas em pH próximo de neutro. IgGs que não se ligam a FcRn depois de consumo em células entram em compartimentos lisossômicos e são degradadas. Consistente com este modelo é a hipótese de que polipeptídeos compreendendo uma região Fc variante que se liga a FcRn com aumentada afinidade têm uma meia vida no soro maior do que aquelas com uma afinidade menor.

[0212] O papel de FcRn como um transportador de IgG indica que as regiões Fc

variantes com alterada afinidade com FcRn podem ter utilidade terapêutica ou no contexto de um anticorpo monoclonal ou quando operavelmente ligadas a uma proteína heteróloga, i.e., um não anticorpo. Polipeptídeos terapêuticos que seriam beneficiados sendo limpos rapidamente do sujeito ou paciente ou não sendo transportado através de uma membrana placentária, e.g., polipeptídeos radiomarcados, seriam beneficiados sendo operavelmente ligados a uma região Fc que manifesta diminuída afinidade de ligação de FcRn. Alternativamente, polipeptídeos que seriam beneficiados por terem uma meia vida no soro maior e portanto necessidade de serem administrados menos vezes ou sendo transportados através de uma membrana placentária iriam preferencialmente ser operavelmente ligados a uma região Fc que manifesta realçada afinidade de ligação de FcRn (veja Tabelas 2, 5 e 6). Numerosas combinações de características de Fc são contempladas, e.g., uma região Fc com realçada afinidade de ligação de FcRn mas com pouca ou nenhuma atividade de CDC ou ADCC pode ser gerada incorporando uma ou mais substituições de aminoácidos de Fc que aumentam afinidade de ligação de FcRn como listado na Tabela 2 em, e.g., uma região Fc originário de IgG4, ou em uma região Fc originário de IgG1 em combinação com substituição de aminoácido que diminui atividade de CDC e ADCC.

[0213] Polipeptídeos preferidos que seriam beneficiados a partir de uma meia vida no soro aumentada sendo operavelmente ligados a uma região Fc variante da invenção que manifesta aumentada afinidade de ligação de FcRn quando comparado com o polipeptídeo originário são polipeptídeos terapêuticos de mamífero incluindo moléculas tal como, e.g., renina; um hormônio de crescimento; hormônio de crescimento humano; hormônio de crescimento bovino; fator de liberação de hormônio de crescimento; grelina; hormônio de paratireóide; hormônio estimulante de tireóide; lipoproteína; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; anitripsina- α 1; PAI-1; proinsulina; trombopoietina; hormônio estimulante de folículo; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagons; fatores coagulantes tal como fator VIIIc, fator IX, fator de tecido (TF), e fator de von Willebrands; fatores anticoagulantes tal como Proteína C; fator natriurético atrial; surfactante de pulmão;

um ativador de plasminogênio, tal como uroquinase ou urina humana ou ativador de plasminogênio tipo tecido (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; interleucinas, e.g., IL-1 a IL-10; IL-20; fator de necrose de tumor alfa e beta; encefalinase; uma albumina de soro tal como albumina de soro humana; substância Muellieriana-inibidora; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; Dnase; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; integrina; proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervos tal como NGF-beta; cardiotrofinas (fator de hipertrofia cardíaca) tal como cardiotrofina-1 (CT-1); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto tal como um aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF) ou seu receptor; fator de crescimento transformante (TGF) tal como TGF-alfa e TGF beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento tipo insulina I e II; des (1-3)-IGF-I (IGF-I de cérebro); proteínas ligando fator de crescimento tipo insulina; proteínas CD tal como CD-3, CD-4, CD-8, e CD-19; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética de osso (BMP); um fator de diferenciação de crescimento (e.g., GDF8), um interferon tal como interferon-alfa, beta e gama; fatores estimulantes de colônia (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; um anticorpo anti-HER-2 sem uma região FC nativa de uma IgG; um anticorpo anti-RSV sem uma região FC nativa de uma IgG; superóxido dismutase; receptores de célula T; proteínas de superfície de membrana, fator acelerador de decaimento; antígeno viral tal como, por exemplo, uma porção do envelope de AIDS; proteínas de transporte; receptores de residência; adressinas; proteínas reguladoras; anticorpos sem uma região FC nativa de uma IgG; e fragmentos ou precursores de qualquer dos polipeptídeos acima listados.

[0214] A região Fc variante compreendendo uma substituição de aminoácido da invenção que confere uma alterada meia vida no soro no polipeptídeo (i.e.,

aumentada afinidade de ligação de FcRn) ao qual ela é operavelmente ligada é preferivelmente operavelmente ligada ao término carboxi ou amino do polipeptídeo de interesse por causa disso gerando uma proteína de fusão.

Seqüências de Ácidos Nucleicos Codificando Regiões Fc Variantes

[0215] A presente invenção também fornece seqüências de ácidos nucleicos codificando regiões Fc variantes, assim como composições, vetores, e células hospedeiras compreendendo seqüências de ácidos nucleicos codificando regiões Fc variantes. A presente invenção também fornece métodos recombinantes para produzir região Fc variante.

[0216] Geralmente, para produção recombinante de variantes, ácido nucleico codificando a variante é isolado e inserido em um vetor. Células hospedeiras podem ser transfectadas com o vetor, por causa disso permitindo que a seqüência de ácidos nucleicos seja amplificada, e/ou o peptídeo variante produzido. Seqüências de ácidos nucleicos codificando as variantes de peptídeos da presente invenção podem ser isoladas e seqüenciadas usando procedimentos convencionais (e.g., usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a um ácido nucleico codificando a variante). Geralmente, a seqüência de ácidos nucleicos codificando a variante é operavelmente ligada a outros elementos, tal como uma seqüência sinal (e.g., seqüências sinal secretoras), uma origem de replicação, pelo menos um marcador de gene, um reforçador, um promotor, ou um terminador de transcrição. Em certas formas de realização, células hospedeiras são estavelmente transfectadas com ácido nucleico codificando uma variante para gerar uma linhagem celular expressando uma variante particular. Em formas de realização preferidas, as variantes são expressas em células CHO, NOS, Sp2/0, PER.C6, ou HEK293. Métodos recombinante são bem conhecidos na arte.

[0217] Seqüências de ácidos nucleicos podem ser mutadas de forma que regiões Fc variantes possam ser produzidas. Por exemplo, uma seqüência de ácidos nucleicos codificando uma região Fc originário (e.g., SEQ ID NOs: 1-12) pode ser mutada de forma que pelo menos um de aminoácido muda resultados quando a seqüência de ácidos nucleicos é expressa. Também, seqüências de ácidos

nucleicos codificando pelo menos uma porção de uma região Fc originário podem ser mutadas para produzir seqüências de aminoácidos compreendendo pelo menos uma porção de uma região Fc variante.

[0218] Em certas formas de realização, síntese baseada em códon é empregada para gerar seqüências mutadas. Exemplos de síntese baseada em códon incluem, por exemplo, aquelas descritas em Patente Norte-Americana Nos. 5.264.563, 5.523.388 e 5.808.022. Resumidamente, síntese baseada em códon pode ser realizada acoplando seqüencialmente monômeros em suportes separados para formar pelo menos dois diferentes tupletos. O acoplamento pode ser realizado em reatores separados, então misturando os suportes dos reatores, e repetindo as etapas de acoplamento, mistura e divisão uma ou mais vezes nos reatores, terminando com uma etapa de mistura ou divisão. Adicionalmente, os oligonucleotídeos podem ser clivados a partir dos suportes.

Usos e Formulações Terapêuticas

[0219] Em algumas formas de realização, a presente invenção fornece formulações terapêuticas compreendendo as variantes descritas neste lugar. Não é pretendido que a presente invenção seja limitada pela natureza particular da composição terapêutica. Por exemplo, tais composições podem incluir um polipeptídeo variante (ou porção desta), fornecido junto com líquidos, géis, portadores sólidos, diluentes, adjuvantes e excipientes fisiologicamente toleráveis, e combinações destes (Veja, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition. Osol, A. Ed. (1980)).

[0220] Em adição, polipeptídeos variantes podem ser usados junto com, antes de, ou subsequente a outros agentes terapêuticos, incluindo, mas não limitados a, salicatos, esteróides, imunossuppressores, anticorpos ou antibióticos. Agentes terapêuticos particulares que podem ser usados com as variantes da presente invenção incluem, mas não são limitados a, os seguintes agentes: compostos de azobenzeno (Patente Norte-Americana No. 4.312.806), derivados de rodamina benzil-substituídos (Patente Norte-Americana No. 5.216.002), sais de L-carnosina de zinco (Patente Norte-Americana No. 5.238.931), 3-fenil-5-carboxipirazóis e isotiazóis

(Patente Norte-Americana No. 5.294.630) IL-10 (Patente Norte-Americana No. 5.368.854), inibidores de síntese de leucotrieno de quinolina (Patente Norte-Americana No. 5.391.555), 2'-halo-2'-desoxiadenosina (Patente Norte-Americana No. 5.506.213), compostos de fenol e benzamida (Patente Norte-Americana No. 5.552.439), tributirina (Patente Norte-Americana No. 5.569.680), certos peptídeos (Patente Norte-Americana No. 5.756.449), ácidos polinsaturados de ômega-3 (Patente Norte-Americana No. 5.792.795), bloqueadores de VLA-4 (Patente Norte-Americana No. 5.932.214), metassulfobenzoato de prednisolona (Patente Norte-Americana No. 5.834.021), agentes contendo citocina (Patente Norte-Americana No. 5.888.969) e nicotina (Patente Norte-Americana No. 5.889.028).

[0221] Polipeptídeos variantes podem ser usados junto com agentes que reduzem a viabilidade ou potencial de proliferação de uma célula. Agentes que reduzem a viabilidade ou potencial de proliferação de uma célula podem funcionar de uma variedade de maneiras incluindo, por exemplo, inibindo síntese de DNA, inibindo divisão celular, induzindo apoptose, ou induzindo morte celular não apoptótica. Exemplos específicos de agentes citotóxicos e citostáticos, incluem mas não são limitados a, proteína antiviral de caruru-de-cacho, abrina, ricina, e cada de suas cadeias A, doxorubicina, cisplastina, iodo-131, ítrio-90, rênio-188, bismuto-212, taxol, 5-fluoroacil, VP-16, bleomicina, metotrexato, vindesina, adriamicina, vincristina, vinblastina, BCNU, mitomicina e ciclofosfamida e certas citocinas tal como TNF- α e TNF- β . Assim, agentes citotóxicos e citostáticos podem incluir, por exemplo, radionuclídeos, drogas quimioterapêuticas, proteínas, e lectinas.

[0222] Composições terapêuticas podem conter, por exemplo, tais aditivos normalmente empregados como ligantes, cargas, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsificantes, tampões e excipientes como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, e os semelhantes. Estas composições tipicamente contêm 1%-95% de ingrediente ativo, preferivelmente 2%-70% de ingrediente ativo.

[0223] Os polipeptídeos variantes da presente invenção também podem ser misturados com diluentes ou excipientes que são compatíveis e fisiologicamente

toleráveis. Diluentes e excipientes adequados são, por exemplo, água, salina, dextrose, glicerol, ou os semelhantes, e combinações destes. Em adição, se desejado, as composições podem conter quantidades mínimas de substâncias auxiliares tal como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes estabilizantes ou de tamponamento de pH.

[0224] Em algumas formas de realização, as composições terapêuticas da presente invenção são preparadas ou como soluções ou suspensões líquidas, como pulverizações, ou em formas sólidas. Formulações orais normalmente incluem tais aditivos normalmente empregados como ligantes, cargas, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsificantes, tampões e excipientes como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, e os semelhantes. Estas formulações assumem a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de liberação sustentada, ou pós, e tipicamente contêm 1%-95% de ingrediente ativo, preferivelmente 2%-70% de ingrediente ativo. Um exemplo de uma composição oral útil para entregar as composições terapêuticas da presente invenção é descrito em Patente Norte-Americana No. 5.643.602.

[0225] Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração, tal como administração tópica, incluem unguentos, tinturas, cremes, loções, esparadrapos transdermais, e supositórios. Para unguentos e cremes, ligantes, portadores e excipientes tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicérides. Um exemplo de um método de entrega tópica é descrito em Patente Norte-Americana No. 5.834.016. Outros métodos de entrega lipossômica também podem ser empregados (Veja, e.g., Patente Norte-Americana Nos. 5.851.548 e 5.711.964).

[0226] As formulações também podem conter mais do que um composto ativo como necessário para a indicação particular sendo tratada, preferivelmente aqueles com atividade complementar que não afetam adversamente um ao outro. Tais moléculas são adequadamente presentes em combinação com quantidades que são efetivas para o propósito pretendido.

[0227] Preparações de liberação sustentada também podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o polipeptídeo variante, cujas matrizes são na forma de artigos com forma, e.g., filmes, ou microcápsula. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem, mas não são limitados a, poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), ou poli (vinilálcool)), polilactídeos, copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tal como o LUPRON DEPOT (microsféricas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e poli-D(-)-3-ácido hidroxibutírico. Enquanto polímeros tal como acetato de etileno-vinil e ácido láctico-ácido glicólico possibilitam liberação de moléculas por volta de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos.

[0228] Os polipeptídeos variantes da presente invenção podem ser usados para tratar um sujeito. Tal tratamento pode ser administrado a um sujeito com uma doença, ou pode ser administrado profilaticamente a um sujeito (e.g., a um sujeito predisposto à doença). Exemplos de condições que devem ser tratadas incluem, mas não são limitados a, câncer (e.g., onde o polipeptídeo variante se liga ao receptor HER-2, CD20 ou fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)); condições alérgicas tal como asma (com um anticorpo anti-IgE); e desordens mediadas por LFA-1 (e.g., onde o polipeptídeo variante é um anticorpo anti-LFA-I ou anti-ICAM-I) etc.

[0229] Em formas de realização preferidas, as variantes de polipeptídeos usadas para tratar sujeitos compreendem anticorpos ou imunoadesinas. Também em formas de realização preferidas, as doenças tratadas são doenças responsivas a anticorpo ou imunoadesina. Exemplos de doenças responsivas a anticorpo incluem doenças e condições médicas tal como: linfoma (mostrado ser tratável com RITUXAN, e anticorpo anti-CD20), doença infecciosa (mostrado ser tratável com SYNAGIS, e anticorpo direcionado para a proteína F de vírus sincial respiratório), transplante de rim (ZENAPAX, e anticorpo anti-receptor de IL-2, mostraram serem úteis), doença

de Crohn e artrite reumatóide (mostrado ser tratável com REMICADE, um anticorpo anti-TNF- α), carcinoma de mama (mostrado ser tratável com HERCEPTIN, um anticorpo anti-20 HER2), e câncer de colo (mostrado ser tratável com EDRECOLOMAB, um anticorpo anti-17-1A). Polipeptídeos variantes usados para tratar câncer deveriam preferivelmente compreender uma substituição de aminoácido de região Fc da invenção que confere aumentada atividade de ADCC e ou aumentada atividade de CDC no polipeptídeo.

[0230] Em algumas formas de realização, um polipeptídeo variante com melhorada atividade de ADCC é empregado no tratamento de doenças ou desordens onde destruição ou eliminação de tecido ou microorganismos estrangeiros é desejada. Por exemplo, a variante pode ser usada para tratar câncer; desordens inflamatórias; infecções (e.g., infecções bacterianas, virais, fúngicas ou de levedura); e outras condições (tal como bócio) onde remoção de tecido é desejada. Em outras formas de realização, o polipeptídeo variante tem atividade de ADCC diminuída. Tais variantes podem ser usadas para tratar doenças ou desordens onde um polipeptídeo contendo região Fc com meia vida longa é desejado, mas o polipeptídeo preferivelmente não tem função(ões) efetora(s) indesejada(s). Por exemplo, o polipeptídeo contendo região Fc pode ser um anticorpo anti-fator de tecido (TF); anticorpo anti-IgE; e anticorpo anti-integrina (e.g., um anticorpo anti-a 437). O mecanismo de ação desejado de tais polipeptídeos contendo região Fc pode ser bloquear pares de ligação ligante-receptor. Além disso, o polipeptídeo contendo região Fc com atividade de ACC diminuída pode ser um anticorpo agonista.

[0231] Polipeptídeos variantes usados para tratar câncer deveriam preferivelmente compreender uma substituição de aminoácido de região Fc da invenção (veja, e.g., Tabela 2 neste lugar) que confere aumentada atividade de ADCC e ou aumentada atividade de CDC no polipeptídeo.

[0232] Os polipeptídeos variantes da presente invenção podem ser administrados por qualquer meio adequado, incluindo administração parenteral, subcutânea, tópica, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, e, intralesional (e.g.,

para tratamento imunossupressor local). Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, ou subcutânea. Em adição, a variante de polipeptídeo é adequadamente administrada por infusão de pulso, particularmente com doses declinantes do polipeptídeo variante. Preferivelmente, a dosagem é dada por injeções, mais preferivelmente injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é resumida ou crônica.

[0233] Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada de variante de polipeptídeo irá depender do tipo de doença a ser tratada, da severidade e curso da doença, se o polipeptídeo variante é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, do histórico clínico de paciente e resposta à variante de polipeptídeo, e da discreção do clínico atendente. O polipeptídeo variante é adequadamente administrado ao paciente em uma vez ou por uma série de tratamentos.

[0234] Por exemplo, dependendo do tipo e severidade da doença, cerca de 0,1 µg/kg a 15 mg/kg (e.g., 0,120 mg/kg) de polipeptídeo variante é uma dosagem inicial candidata para administração para o paciente, quer, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas por diversos dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até que sintomas sejam suficientemente reduzidos ou eliminados. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais, e pode ser usado para ajustar dosagem para atingir um efeito terapêutico.

[0235] Estas quantidades sugeridas de polipeptídeo variante são sujeitas a um grande negócio de discreção terapêutica. O fator chave para selecionar uma dose e programação é o resultado obtido. Fatores para consideração neste contexto incluem a desordem particular sendo tratada, o mamífero particular sendo tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa da desordem, o sítio de entrega do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, a programação de administração, e outros fatores conhecidos por praticantes médicos.

[0236] Uma quantidade terapeuticamente efetiva de um polipeptídeo variante a ser administrada é o nível de dosagem requerido por um paciente tal que os sintomas da doença sendo tratada são reduzidos. Adicionalmente, uma quantidade terapeuticamente efetiva pode se referir à quantidade de agente terapêutico suficiente para atrasar ou minimizar ou prevenir o início de doença, e.g., atrasar ou minimizar ou prevenir o espalhamento de câncer. Uma quantidade terapeuticamente efetiva pode se referir à quantidade de agente terapêutico (e.g., polipeptídeo variante) também pode se referir à quantidade de agente terapêutico que fornece um benefício terapêutico no tratamento ou administração de uma doença em um sujeito. Ademais, uma quantidade terapeuticamente efetiva com respeito a um agente terapêutico da invenção se refere à quantidade de agente terapêutico sozinho, ou em combinação com outras terapias, que fornece um benefício terapêutico no tratamento ou administração de uma doença em um sujeito. O polipeptídeo variante não necessita ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agentes atualmente usados para prevenir ou tratar a desordem em questão. A quantidade efetiva de tais outros agentes depende da quantidade de polipeptídeo variante presente na formulação, do tipo de desordem ou tratamento, e de outros fatores discutidos acima. Um primeiro agente profilático ou terapêutico (e.g., polipeptídeo variante ou polipeptídeo compreendendo uma região Fc variante da invenção ou fragmento funcional desta) pode ser administrado antes de, concomitantemente com, ou subsequente à administração de um segundo agente profilático ou terapêutico para um sujeito com uma desordem.

[0237] Agentes terapêuticos da invenção podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos em um portador estéril adequado antes de uso. Liofilização e reconstituição podem levar a graus variantes de perda de atividade de anticorpo. Dosagens podem ter que ser ajustadas para compensar. Geralmente, pH entre 6 e 8 é preferido.

[0238] O uso de um anticorpo monoclonal compreendendo uma região Fc variante da presente invenção para tratamento ou prevenção de pelo menos uma das desordens acima mencionadas (e.g., câncer) no qual o antígeno ao qual o

anticorpo monoclonal se liga é prejudicial ou que se beneficia de níveis diminuídos do antígeno é contemplado neste lugar. Adicionalmente, é contemplado o uso de um anticorpo compreendendo uma região Fc variante da presente invenção para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de pelo menos uma das desordens acima mencionadas.

[0239] Como usado neste lugar, os termos “tratamento”, “tratar”, e os semelhantes, se referem a obter um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completamente ou parcialmente uma doença ou sintoma desta e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento”, como usado neste lugar, inclui administração de um composto da presente invenção para tratamento de uma doença ou condição em um mamífero, particularmente em um humano, e inclui: (a) prevenir a doença de ocorrer em um sujeito que pode ser pré-disposto à doença mas ainda não foi diagnosticado com tendo ela; (b) inibir a doença, i.e., seqüestrar seu desenvolvimento, e (c) aliviar a doença, i.e. causar regressão da doença ou desordem ou aliviar sintomas ou complicações desta. Regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta ótima desejada (e.g., uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, uma injeção única pode ser administrada, diversas doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Anticorpos Anti-CD20

[0240] Um anticorpo anti-CD20 compreendendo uma região Fc variante da presente invenção é contemplado para cair dentro do escopo da invenção (veja, e.g., Exemplo 4 e Figura 4 neste lugar). Em uma forma de realização, um anticorpo anti-CD20 compreende uma região Fc variante da invenção, ou porção desta compreendendo a substituição de aminoácido, como listado nas Tabelas 1-10 neste lugar, o anticorpo anti-CD20 pode adicionalmente compreender um peptídeo com a seqüência mostrada em SEQ ID NO: 13, 14, 15 ou 16. Em outra forma de realização, um anticorpo anti-CD20 compreende uma região Fc variante da

invenção, ou porção desta compreendendo a substituição de aminoácido, como listado nas Tabelas 1-10 neste lugar, e adicionalmente compreende peptídeos com as seqüências mostradas em:

SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16;
SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 e 22; ou
SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

[0241] Mais preferivelmente, um anticorpo anti-CD20 da invenção compreende uma região Fc variante, ou porção desta, compreendendo substituição(ões) de aminoácido(s) selecionada(s) do grupo consistindo de:

247I e 339D;
247I e 339Q; e
378D;

[0242] e adicionalmente compreende uma região variável compreendendo polipeptídeos com as seqüências selecionadas do grupo consistindo de:

SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14;
SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16;
SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21 e 22; ou
SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

Usos Adicionais de Região Fc Variante

[0243] As variantes, e seqüências de ácidos nucleicos codificando variantes, da presente invenção podem ser usadas de muitas maneiras. Por exemplo, variantes da presente invenção podem ser usadas em ensaios de seleção de fármaco. Por exemplo, compostos candidatos podem ser avaliados para sua habilidade para alterar ou interferir em funções efetoras de Fc pondo em contato uma variante com o composto candidato e determinando ligação do composto candidato à variante. A variante pode ser imobilizada usando métodos conhecidos na arte tal como ligar uma proteína de fusão GST-variante a um grânulo polimérico contendo glutatona. Um gene quimérico codificando uma proteína de fusão GST é construído fusionando DNA codificando a variante de interesse ao DNA codificando o término carboxil de

GST (Veja, e.g., Smith et al., Gene 67:31 [1988]). O construto de fusão é então transformado em um sistema de expressão adequado (e.g., E. coli Xa90) no qual a expressão da proteína de fusão GST pode ser induzida com isopropil-f-D-tiogalactopiranosida (IPTG). Indução com IPTG deve produzir a proteína de fusão com um constituinte principal de proteínas celulares solúveis. As proteínas de fusão podem ser purificadas por métodos conhecidos por aqueles versados na arte, incluindo purificação por cromatografia de afinidade de glutathione. Ligação do composto candidato à variante é correlacionada com a habilidade do composto para interromper a uma ou mais funções efetoras.

[0244] Em outro método de seleção, ou a variante ou um FcR selecionado é imobilizado usando métodos conhecidos na arte, tal como adsorção em uma placa microtiter de plástico ou ligação específica de uma proteína de fusão GSTa um grânulo polimérico contendo glutathione. Por exemplo, variante de GST é ligada a grânulos de glutathione-Sefarose. A variante imobilizada é então posta em contato com um FcR e um composto candidato. Peptídeo não ligado é então removido e o complexo solubilizado e analisado para determinar a quantidade de peptídeo marcado ligado. Uma diminuição em ligação é uma indicação que o composto candidato inibe a interação de variante com o FcR. Este método de seleção é particularmente útil com variantes da presente invenção que mostram um nível aumentado de A variação deste método permite a seleção de compostos que são capazes de romper um complexo previamente formado de variante/receptor de Fc. Por exemplo, em algumas formas de realização um complexo compreendendo uma variante ligada a um FcR é imobilizado como descrito acima e contactado com um composto candidato. A dissolução do complexo pelo composto candidato se correlaciona com a habilidade do composto para disrupt ou inibir a interação entre a variante sendo testada e o ser de fcR. Sob esse aspecto, compostos com potencial terapêutico (e.g., em humanos) podem ser identificados (e.g., compostos úteis para tratar doença humana, tal como doenças auto-imunes).

[0245] Outra técnica para seleção de fármaco fornece alta seleção de produção para compostos tendo afinidade de ligação adequada com peptídeos variantes e é

descrita em detalhe em WO 84/03564. Resumidamente, grandes números de diferentes compostos de teste de peptídeos pequenos são sintetizados em um substrato sólido, tal como broches de plástico ou alguma outra superfície. Os compostos de teste de peptídeos são então reagidos com peptídeos variantes e lavados. Peptídeos variantes ligados são então detectados por métodos bem conhecidos na arte.

[0246] Outra técnica usa anticorpos direcionados para peptídeos variantes. Tais anticorpos capazes de se ligar especificamente a peptídeos variantes competem com um composto de teste para ligação a uma dada variante. Desta maneira, os anticorpos podem ser usados para detectar a presença de qualquer peptídeo que compartilha um ou mais determinantes antigênicos do peptídeo variante.

[0247] A presente invenção contempla muitos outros meios de selecionar compostos. Os exemplos fornecidos acima são apresentados meramente para ilustrar uma variação de técnicas disponíveis. Alguém de habitual verso na arte irá apreciar que muitos outros métodos de seleção podem ser usados.

[0248] Em particular, a presente invenção contempla o uso de linhagens celulares transfectadas com ácido nucleico codificando pelo menos uma região Fc variante para selecionar compostos para atividade, e em particular para seleção de alta produção de compostos de bibliotecas combinatórias (e.g., bibliotecas contendo mais do que 10^4 compostos). As linhagens celulares da presente invenção podem ser usadas em uma variedade de métodos de seleção.

[0249] As variantes da presente invenção podem ser usadas como um agente de purificação de afinidade. Por exemplo, a variante pode ser imobilizada em uma fase sólida tal como uma resina de Sefadex ou papel de filtro, usando métodos bem conhecidos na arte. A variante imobilizada é então colocada em contato com uma amostra contendo o antígeno a ser purificado, que é ligado à variante de polipeptídeo imobilizada. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão de glicina, pH 5,0, que irá liberar o antígeno do polipeptídeo variante.

[0250] O polipeptídeo variante também pode ser útil em ensaios diagnósticos

(e.g. para detectar expressão de um antígeno de interesse em células específicas, tecido ou soro). Para aplicações diagnósticas, a variante irá tipicamente ser marcada com uma unidade detectável (tais marcas também são úteis nos ensaios de região Fc descritos acima). Numerosas marcas são disponíveis, incluindo, mas não limitadas a, radioisótopos (e.g., ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I), marcas fluorescentes (e.g., quelados terrosos raros (quelados de európio) ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansil, Lissamina, ficoeritrina e Vermelho Texas), e várias marcas enzima-substrato (veja, e.g., Patente Norte-Americana No. 4.275.149), e luciferase, luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato desidrogenase, urease, peroxidase tal como peroxidase de rábano (HRPO), fosfatase alcalina, 3-galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacarídeo oxidases (e.g., glicose oxidase, galactose oxidase, e glicose-6-fosfato desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tal como uricase e xantina oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase, e os semelhantes). Exemplos de combinações enzima-substrato incluem, por exemplo: peroxidase de rábano (HRPO) com hidrogênio peroxidase como um substrato, caracterizado pelo fato de que a hidrogênio peroxidase oxida um precursor de corante (e.g., ortofenileno diamina (OPD) ou 3,3',5,5'-tetrametil benzidina hidrocloreto (TMB)); (ii) fosfatase alcalina (AP) com para-nitrofenil fosfato como substrato cromogênico; e (iii) -D-galactosidase (R-D-Gai) com um substrato cromogênico ou substrato fluorogênico.

[0251] As variantes da presente invenção também podem ser usadas para ensaios diagnósticos in vivo. Por exemplo, o polipeptídeo variante é marcado com um radionuclídeo tal que o antígeno ou células expressando ele podem ser localizados usando imunocintilografia.

Tabela 1 Variantes de Fc (pg101)

<u>Posição*</u>	<u>Substituição de aminoácidos*</u>
235	G, R
236	F, R, Y
237	K, N, R
238	E, G, H, I, L, V, W, Y
244	L
245	R
247	A, D, E, F, M, N, Q, R, S, T, W, Y
248	F, P, Q, W
249	L, M, N, P, Y
251	H, I, W
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y
255	K, N
256	H, I, K, L, V, W, Y
257	A, I, M, N, S
258	D
260	S
262	L
264	S
265	K, S
267	H, I, K
268	K
269	N, Q
271	T
272	H, K, L, R
279	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
280	T
283	F, G, H, I, K, L, M, P, R, T, W, Y
286	F
288	N, P
292	E, F, G, I, L
293	S, V
301	W
304	E
307	E, M
312	P
315	F, K, L, P, R
316	F, K
317	P, T
318	N, P, T
332	F, G, L, M, S, V, W
339	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, W, Y
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
343	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
373	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W
375	R
376	E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
377	G, K, P
378	D, N
379	N, Q, S, T

380	D, N, S, T
382	D, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
385	E, P
386	K
423	N
424	H, M, V
426	D, L
427	N
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
431	H, K, P
432	R, S
438	G, K, L, T, W
439	E, H, Q
440	D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, T, V
442	K

⁺ posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

- e.g., em posição 249: 249L, 249M, 249N ou 249Y.

Tabela 2 Variantes de Fc: mudanças de função efetora

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
235G						X
235Q		X		X		
235R		X				
235S		X				X
236F		X				
236R		X				X
236Y		X		X	X	
237E		X				X
237K		X		X		X
237N		X				X
237R		X		X		X
238A		X				X
238E		X		X		X
238G		X		X		X
238H		X		X		X
238I		X				X
238L		X	X			X
238V		X				X
238W		X		X		X
238Y		X		X		X
244L			X		X	
245R		X	X			X
247A	X			X	X	
247D				X	X	
247E				X	X	
247F	X			X		
247G		X		X	X	
247H	X			X		X
247J	X			X		X
247L	X			X		X
247M	X			X		
247N				X	X	
247Q				X	X	
247R		X		X	X	
247S				X	X	
247T	X					X
247V	X					
247W				X	X	
247Y	X			X		X
248A				X		
248F				X	X	
248P				X	X	
248Q				X	X	
248W				X	X	

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
249E	X			X	X	
249L		X		X	X	
249M				X	X	
249N					X	
249P		X	X		X	
249Y	X			X	X	
250K		X			X	
250M		X	X			X
250R		X		X	X	
251F	X			X	X	
251H		X		X	X	
251I		X		X	X	
251W		X		X	X	
252Y		X	X			X
254A				X	X	
254D				X		X
254E				X		X
254F	X			X	X	
254G				X		
254H				X		
254I				X		X
254K				X	X	
254L		X		X	X	
254M	X			X	X	
254N				X		
254P		X		X		X
254Q		X		X		X
254R				X	X	
254T		X		X		X
254V		X		X		X
254W				X	X	
254Y	X			X	X	
255K				X	X	
255N				X		X
256A	X		X		X	
256F	X			X		
256G			X		X	
256H				X		
256I				X	X	
256K				X		
256L					X	
256M	X			X	X	
256P			X		X	
256Q				X	X	
256R				X		
256V		X				

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
256W				X	X	
258Y				X	X	
257A		X	X			X
257I		X	X			X
257M		X	X			X
257N		X	X			X
257S		X	X			X
257V		X	X			X
258D	X		X			
260S		X	X		X	
262L		X	X			X
264S		X		X		X
265H		X				X
265K		X				
265S		X		X		
265Y		X		X		X
267G		X		X		X
267H		X				X
267I		X		X		X
267K		X				X
268D	X			X	X	
268E	X		X			
268K				X		X
269N		X				X
269Q		X				X
270A		X		X		X
270G		X				X
270K		X	X			X
270M		X		X		X
270N		X				X
271T		X				X
272H		X	X			X
272K		X	X			
272L		X	X			X
272N		X				X
272R		X	X			
279A	X		X			
279D		X	X			
279F		X				
279G			X			
279H			X			
279I				X		
279K		X		X		
279L		X		X		
279M			X			
279N			X			

Variante ⁺	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
279Q			X		X	
279R			X			
279S			X		X	
279T			X			
279W		X	X		X	
279Y			X		X	
280A	X			X		
280K	X				X	
280T				X	X	
283A	X		X			
283D		X	X			
283F		X	X		X	
283G		X	X		X	
283H		X	X		X	
283I	X		X		X	
283K	X		X		X	
283L		X	X		X	
283M	X				X	
283N			X		X	
283P			X		X	
283Q			X			
283R	X		X		X	
283S			X		X	
283T			X			
283W		X	X		X	
283Y		X	X			
285N		X	X			
286F			X			
288N	X		X			
288P		X	X			
292A	X					X
292E		X		X		
292F		X		X		
292G		X		X		
292I		X		X		
292L				X	X	
293S		X				X
293V		X	X			
301W		X				X
304E		X				
307A		X	X		X	
307E		X	X			X
307M		X	X		X	
311A	X		X			
311D	X			X		
311E				X		X

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
311F		X		X	X	
311G				X		
311J		X	X		X	
311K		X	X		X	
311L			X		X	
311M			X		X	
311R				X	X	
311N	X			X		
311S		X				X
311T	X				X	
311V	X		X		X	
311W			X		X	
311Y	X			X	X	
312P		X	X		X	
314F		X		X	X	
314I		X			X	
314V		X		X	X	
314W		X		X	X	
314Y					X	
315F		X		X	X	
315K				X	X	
315L	X				X	
315P		X		X	X	
315R					X	
316F		X		X		X
316K			X		X	
317P		X	X		X	
317T				X	X	
318N	X		X		X	
318P	X					X
318T	X		X		X	
318V	X					
326W		X		X	X	
327T		X		X		X
328V		X				X
329Y		X				X
330K	X					X
330R						X
332A					X	
332D	X				X	
332E	X				X	
332F			X		X	
332G					X	
332H		X	X		X	
332K		X	X			X
332L		X	X		X	

Variante ⁺	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
332M			X		X	
332N					X	
332Q					X	
332R		X	X			
332S			X		X	
332T	X				X	
332V	X				X	
332W		X	X		X	
332Y					X	
339D	X				X	
339E				X		X
339F	X				X	
339G	X			X	X	
339H					X	
339I	X				X	
339K	X				X	
339L				X		
339M	X					X
339N	X		X		X	
339Q	X				X	
339R	X			X	X	
339S	X				X	
339T	X		X		X	
339W			X		X	
339Y					X	
341D		X		X	X	
341E		X		X	X	
341F		X		X	X	
341H		X			X	
341I		X		X	X	
341K		X		X	X	
341L		X		X	X	
341M		X		X	X	
341N		X		X	X	
341P		X	X		X	
341Q		X		X	X	
341R		X		X	X	
341S		X		X	X	
341T		X		X	X	
341V				X	X	
341W		X		X	X	
341Y		X		X	X	
343A		X			X	
343D		X			X	
343E		X	X		X	
343F		X				

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
343G		X			X	
343H		X	X		X	
343I						X
343K			X		X	
343L		X			X	
343M		X		X	X	
343N		X			X	
343Q		X	X		X	
343R		X	X		X	
343S		X			X	
343T		X	X		X	
343V		X		X		
343W		X		X	X	
343Y		X	X		X	
373A		X		X		
373D		X		X	X	
373E		X			X	
373F		X			X	
373G		X		X		
373H					X	
373I		X			X	
373K		X		X	X	
373L		X		X	X	
373M		X		X	X	
373N		X		X	X	
373Q		X		X	X	
373R		X			X	
373S		X		X		X
373T		X		X	X	
373V		X		X	X	
373W		X		X	X	
375R		X	X		X	
376A	X		X		X	
376E		X				
376F		X			X	
376G		X	X		X	
376H		X		X	X	
376I			X			
376L				X	X	
376M			X			
376N					X	
376P			X		X	
376Q					X	
376R					X	
376S					X	
376T			X		X	

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
376V	X		X		X	
376W		X		X		
376Y		X		X		
377G	X					
377K	X		X			
377P					X	
378D			X			X
378N			X			
379N	X				X	
379Q		X			X	
379S					X	
379T					X	
380A			X		X	
380D						X
380N	X		X		X	
380S	X		X		X	
380T			X		X	
382A	X					
382D		X				X
382F	X		X			X
382H			X			
382I	X		X		X	
382K			X			
382L			X		X	
382M			X			
382N			X			X
382P						X
382Q			X		X	
382R			X			X
382S		X	X			X
382T			X			
382V			X		X	
382W			X			X
382Y			X			X
385E	X					X
385P						X
386K					X	
423N			X			X
424H						X
424M		X		X		X
424V				X		
426D				X	X	
426L					X	
427N	X		X			X
429A		X		X	X	
429F		X		X	X	

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
429M	X			X	X	
430A			X		X	
430D				X	X	
430F			X		X	
430G			X		X	
430H		X	X		X	
430I			X		X	
430K		X	X		X	
430L			X		X	
430M			X		X	
430N		X	X		X	
430P					X	
430Q		X	X			
430R		X	X		X	
430S			X		X	
430T			X		X	
430V			X		X	
430W		X		X	X	
430Y			X		X	
431H			X		X	
431K			X			
431P				X	X	
432R		X		X	X	
432S		X		X	X	
434G			X			X
434H			X			X
434I		X		X		X
434W	X		X		X	
434Y			X		X	
436I	X		X			X
436L			X			
436T			X			X
438G						X
438K			X			
438L			X		X	
438T			X			X
438W			X		X	
439E						X
439H						X
439Q				X		X
440A				X		X
440D		X		X		
440E				X		
440F				X		X
440G	X					X
440H	X		X			

Variante*	ADCC realçado	ADCC diminuído	Ligação FcRn realçada	Ligação FcRn diminuída	CDC realçado	CDC diminuído
440I	X					X
440K			X			X
440L	X		X			X
440M				X		X
440N						
440Q					X	
440R						
440T		X				
440V		X				
440W						
440Y					X	
442K		X	X			

* Variantes testadas em anticorpo anti-CD20, região Fc de IgG1

Tabela 3 ADCC realçada

Posição*	Substituição de aminoácidos*
247	A, F, H, I, L, M, T, V, Y
249	E, Y
251	F
254	F, M, Y
256	A, M
258	D
268	D, E
279	A
280	A, K
283	A, I, K, M, R
288	N
292	A
311	A, D, N, T, V, Y
315	L
318	N, P, T, V
330	K
332	T, V
339	D, F, G, I, K, M, N, Q, R, S, T
376	A, V
377	G, K
379	N
380	N, S
382	A, I
385	E
427	N
429	M
434	W
436	I
440	G, H, I, L

* posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

- e.g., em posição 249: 249E ou 249Y.

Tabela 4 ADCC diminuída

<u>Posição*</u>	<u>Substituição de aminoácidos*</u>
235	Q, R, S
236	F, R, Y
237	E, K, N, R
238	E, G, H, I, L, V, W, Y
247	G, R
249	L, P
250	K, M, R
251	H, I, W
252	Y
254	L, P, Q, T, V
256	V
257	A, I, M, N, S, V
260	S
262	L
264	S
265	H, K, S
267	G, H, I, K
269	N, Q
270	A, G, K, M, N
271	T
272	H, K, L, N, R
279	D, F, K, L, W
283	D, F, G, H, L, T, W, Y
285	N
288	P
292	E, F, G, I
293	S, V
301	W
304	E
307	A, E, M
311	P, I, K, S
312	P
314	F, I, V, W
315	F, P
316	F
317	P
327	T
328	V
329	Y
332	G, K, L, R, N
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
343	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
373	A, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W
375	R
376	A, E, F, G, H, W, Y
379	Q
382	D, S
429	A, F
430	H, K, N, Q, R, W
432	R, S
434	I
440	D, T, V
442	R

* posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

Tabela 5 Afinidade de Ligação de FcRn realçada

<u>Posição*</u>	<u>Afinidade de ligação de FcRn realçada</u>
238	L
244	L
245	R
249	P
252	Y
256	P
257	A, I, M, N, S, V
258	D
260	S
262	L
270	K
272	L, R
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
285	N
286	F
288	N, P
293	V
307	A, E, M
311	A, I, K, L, M, V, W
312	P
316	K
317	P
318	N, T
332	F, H, K, L, M, R, S, W
339	N, T, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
375	R
376	G, I, M, P, T, V
377	K
378	D, N
380	N, S, T
382	F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
423	N
427	N
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
434	F, G, H, W, Y
436	I, L, T
438	K, L, T, W
440	K
442	K

* posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

Tabela 6 Afinidade de Ligação de FcRn diminuída

Posição*	Substituição de aminoácidos
235	Q
236	Y
237	K, R
238	E, G, H, W
247	A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, W, Y
248	A, F, P, Q, W
249	E, L, M, Y
251	F, H, I, W
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
255	K, N
256	F, H, I, K, M, R, W, Y
264	S
265	S, Y
267	G, I
268	D, K
270	A, M
279	I, K, L
280	T
292	E, F, G, I, L
311	D, E, F, G, N, R, Y
315	F, K, P
316	F
317	T
326	W
327	T
339	E, G, L, R
341	D, E, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
343	M, V, W
373	A, D, G, K, L, M, N, Q, S, T, V, W
376	H, L, W, Y
424	M, V
426	D
429	A, F, M
430	D, W
431	P
432	R, S
434	I
439	Q
440	A, D, E, F, M

* posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

Tabela 7 CDC realçada

Posição*	Substituição de aminoácidos
236	Y
244	L
247	A, D, E, G, N, Q, R, S, W
248	F, P, Q, W
249	E, L, M, N, P, Y
250	K, R
251	F, H, I, W
254	A, F, K, L, M, R, Y
255	K
256	A, G, I, L, M, P, Q, W, Y
260	S
268	D

---	-
279	Q, S, W, Y
280	K, T
283	F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, W
292	L
307	A, M
311	F, I, K, L, M, T, V, W, Y
312	P
314	F, I, V, W, Y
315	F, X, L, P, R
316	K
317	P, T
318	N, T
332	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
339	D, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, W, Y
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
343	A, D, E, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
373	D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W
375	R
376	A, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V
377	P
379	N, Q, S, T
380	A, N, S, T
382	I, L, Q, V
386	K
426	D, L
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
431	H, P
432	R, S
434	W, Y
438	L, W
440	Q, Y

+ posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

Tabela 8 CDC diminuída (pg118)

<u>Posição*</u>	<u>Substituição de aminoácidos</u>
235	G, S
236	R
237	E, K, N, R
238	A, E, G, H, I, L, V, W, Y
245	R
247	H, I, L, T, Y
250	M
252	Y
254	D, E, I, P, Q, T, V
255	N
257	A, I, M, N, S, V
262	L
264	S
265	H, Y
267	G, H, I, K

268	K
269	N, Q
270	G, M, N
271	T
272	H, L, N
292	A
293	S
301	W
307	E
311	E, S
316	F
318	P
327	T
328	V
329	Y
330	K, R
332	E, M
343	I
373	S
378	D
380	D
382	D, F, N, P, R, S, W, Y
385	E, P
423	N
424	H, M
427	N

+ posição de aminoácido de Fc de acordo com numeração de EU

EXEMPLOS

[0252] Os seguintes exemplos são fornecidos a fim de demonstrar e adicionalmente ilustrar certas formas de realização preferidas e aspectos da presente invenção e não são para serem construídos como limitando o escopo desta.

Exemplo 1 – Selecionando regiões Fc variantes em Ensaio de ADCC

[0253] Este exemplo descreve como regiões Fc variantes, no contexto de um anticorpo (e.g., anti-DC20) são selecionadas em um ensaio de ADCC.

i. Isolamento de Célula Mononuclear de Sangue Periférico (PBMC)

[0254] Cerca de 50 ml de sangue periférico são obtidos a partir de um doador saudável e diluídos 1:2 com salina tamponada com fosfato (PBS), Ph 7,0. As soluções são misturadas rodando suavemente o tubo. Cerca de 12 ml de Histopaque-1077 (Sigma Cat. No. 1077-1) são cuidadosamente dispostos debaixo da amostra

de sangue diluído seguido por centrifugação em uma centrífuga Sorvall RT6000B com rotor basculante a 1000 rpm por 10 min com freio motor. A fase superior do gradiente é descartada por aspiração e a interface de cor branca contendo PBMC coletada e lavada 3 vezes com Solução de Sal Equilibrada de Hanks (Gibco Cat. No. 14025-092). O pellet de célula lavado é suspenso em cerca de 20 ml de meios RPMI 1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Omega Scientific Cat No. FB-01). As PBMCs resuspensas são divididas em dois frascos de cultura T-175, e 30 ml de RPMI contendo 10% de FBS são adicionados a cada, seguido por incubação durante a noite em uma incubadora de 5% de CO₂ a 37 °C. No dia seguinte as PBMCs não aderentes são coletadas em tubos Falcon de 50 ml, centrifugadas como acima e resuspensas em RPMI contendo 1% de FBS carecendo de vermelho de fenol. Uma pequena porção das células resuspensas é diluída 10 vezes e contada usando um hemocitômetro. As PBMCs remanescentes são colocadas em uma incubadora até necessitado.

ii. Linhagem celular alvo (específica para ensaios de ADCC de anti-CD20)

[0255] Linhagens Wil.2 e SKW6.4 de célula B expressando CD20 são obtíveis a partir de ATCC e crescidas como recomendado. Um dia antes de uso, as células são divididas 2 vezes. No dia seguinte o número de células é ajustado para 4×10^5 células/ml e alíquotas de 50 µl (20.000 células/poço) adicionadas a uma placa de cultura de tecido de 96-poços.

iii. Diluições de IgG

[0256] Antes de seleção, IgG compreendendo uma variante de Fc da presente invenção é expressa, purificada e quantificada usando um ELISA padrão. Para seleção de ADCC primária de ponto único, variantes de IgG são diluídas para 40 ng/ml em meios RPMI contendo 1% de FBS carecendo de vermelho de fenol. A concentração final de IgG no ensaio é diluída por 4 vezes (i.e., concentração final de 10 ng/ml). Alíquotas de cinquenta microlitros de IgG são adicionadas às células alvo e incubadas por cerca de 15 minutos a 37 °C antes de adicionar as células efectoras às células alvo opsonizadas.

[0257] Quando titulações de IgG são realizadas, concentração de IgG é variada

na extensão de cerca de 0,0001 a 1 µg/ml. Diluições de IgG são preparadas usando uma placa microtiter de 96-poços diluindo as amostras em RPMI contendo 1% de FBS carecendo de vermelho de fenol. As amostras de IgG diluídas são então adicionadas à placa de ensaio contendo as células alvo.

iv. Células efetoras

[0258] As concentrações de PBMCs são ajustadas para que proporção de efetora para alvo seja na variação de 10-20:1 (i.e., $2-4 \times 10^6$ células/ml). Cem microlitros das PBMCs resuspensas são adicionados a cada poço das células alvo opsonizadas. As placas são então incubadas a 37 °C na presença de 5% de CO₂ por 3-4 horas.

v. Detecção de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

[0259] Lise de célula alvo é medida detectando a liberação de enzima a partir do citoplasma de células danificadas no sobrenadante de cultura. Seguindo incubação das células alvo opsonizadas com as células efetoras, as placas de ensaio são centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Cerca de 75 µl do sobrenadante de cultura celular são cuidadosamente removidos enquanto as células peletizadas e detritos são evitados. Este sobrenadante é adicionado diretamente a uma placa microtiter e a esta são adicionados 75 µl de reagente de detecção de LDH (Roche Cat. No. 1 644 793). A placa é então incubada por aproximadamente 15-30 minutos e absorbância lida em 490 nm usando um Leitor de Vmax Cinética de Microplaca de Molecular Devices.

vi. Análise de Dados

[0260] Todos os ensaios de seleção de ADCC são realizados em duplicata. Cada placa de ensaio contém controles para lise espontânea de alvo, lise espontânea de efetora mais alvo na ausência de IgG e lise total de célula alvo. Lise total de célula alvo é atingida por adição de 1% de Triton X-100 para as células alvo. Controles tipo selvagem são incluídos em cada placa de ensaio e calculada a média do sinal de ensaio de ADCC. O valor de fundo, obtido a partir dos controles de lise espontânea, é subtraído de cada amostra. O valor de fundo, obtido a partir da IgG diluída, é subtraído de cada amostra. Os dados são convertidos de valores de

absorbância para porcentagem de lise específica baseado nos controles de lise espontânea e total. A porcentagem de lise específica é calculada a partir da seguinte equação: porcentagem de lise específica = $(A490 \text{ experimental} - A490 \text{ de fundo}) / (A490 \text{ máximo} - A490 \text{ de fundo}) \times 100$, onde A490 de fundo é a soma do A490 obtido a partir das células efetoras e alvo na ausência de IgG e o fundo de IgG devido a LDH contaminante presente nos sobrenadantes brutos de IgG. A porcentagem da atividade de variante de Fc é normalizada em relação com a média dos controles tipo selvagem. A porcentagem da atividade normalizada para placas de ensaio duplicadas são averaged e o desvio padrão entre placas individuais de ensaio calculado para cada amostra.

vii. Resultados

[0261] As atividades relativas específicas de ADCC são mostradas na Tabelas 9 (substituições únicas) e 10 (substituições combinatórias) abaixo. Os valores de CDC relatados na Tabela 9 são gerados como descrito no Exemplo 2 neste lugar e os valores de ensaio de ligação de FcRn relatados na Tabela 9 são gerados como descrito no Exemplo 3 neste lugar. Resultados são adicionalmente resumidos nas Tabelas 1 e 2 acima. Aquelas substituições combinatórias que produzem um valor de ADCC superior do que cada substituição única sozinha são: 247F,339D; 247I,339D; 247L,339D; 247L,339T; e 247I,339Q. Aquelas substituições combinatórias que produzem um valor de ADCC inferior do que 80% aquele de ADCC tipo selvagem mesmo embora elas tenham superior do que ADCC tipo selvagem quando testadas sozinhas são: 247A,339D; 247Y,339H; 247I,339I; 247T,339I; 247L,339N; 247A,339Q; e 247A,339R. Aquelas substituições combinatórias que produzem um valor de ADCC inferior do que 10% aquele de ADCC tipo selvagem mesmo embora elas tenham superior do que ADCC tipo selvagem quando testadas sozinhas são: 247I,339I; 247T,339I; e 247L,339N.

Tabela 9

WT*	Posição	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	e							
	WT (a,z)	100		100		100		
L	235A	87	23.2	102	11.9	67	7.9	2
L	235E	80	17.4	87	16.2	48	35.8	2
L	235G	93	30.3	85	21.2	58	46.0	2
L	235Q	86	1.8	81	14.4	98	25.1	2
L	235R	45	10.5	93	34.1	110	13.8	2
L	235S	92	2.0	85	40.0	0	262.9	2
G	236F	0	942.1	88	7.9	0	283.3	2
G	236R	0	228.7	101	20.6	14	110.1	4
G	236Y	8	72.7	76	10.0	168	0.3	2
G	237E	0	89.2	93	35.0	36	28.8	4

WT*	Posição	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	e Variantes*							
G	237K	0	113.3	78	12.8	12	138.0	4
G	237N	0	107.5	91	16.3	22	31.5	4
G	237R	0	81.3	56	60.6	28	10.5	4
P	238A	0	205.8	90	9.6	29	49.5	4
P	238E	0	20.6	76	6.7	24	101.0	4
P	238G	0	82.8	66	6.9	23	120.5	4
P	238H	0	48.9	72	11.4	11	206.3	4
P	238I	0	180.4	94	6.4	18	54.1	4
P	238L	0	37.4	115	13.6	34	50.1	4
P	238V	46	11.8	102	8.9	67	19.2	4
P	238W	0	66.6	87	5.4	23	103.4	4
P	238Y	0	34.0	74	15.8	16	288.8	4
P	244L	77	23.4	124	9.6	134	6.0	2
P	245R	62	15.0	188	7.2	42	5.3	2
P	247A	122	16.2	97	0.3	116	0.9	2
P	247D	95	23.4	54	2.8	131	1.1	2
P	247E	95	10.3	52	8.7	118	0.0	2
P	247F	144	18.8	6	1258.9	71	34.1	6
P	247G	82	16.1	75	4.2	137	0.9	2
P	247H	145	11.2	35	252.4	79	7.5	8
P	247I	140	22.9	79	30.7	22	198.3	6
P	247L	144	10.1	57	33.7	0	722.7	18
P	247M	127	21.0	18	1599.0	114	7.2	6
P	247N	91	37.2	41	38.7	109	4.0	2
P	247Q	103	8.5	28	294.3	137	3.7	4
P	247R	58	15.5	72	1.2	127	4.9	2
P	247S	106	38.6	81	15.0	130	2.6	2
P	247T	129	11.2	75	27.5	37	34.8	10
P	247V	120	13.5	Na	na	na	na	2
P	247W	102	6.5	0	1314.2	122	0.5	2
P	247Y	143	8.4	7	na	88	7.1	6
K	248A	100	5.4	15	179.9	102	2.4	2
K	248F	107	18.0	0	559.4	202	4.0	2
K	248P	103	9.1	34	99.4	226	1.3	2
K	248Q	101	0.5	38	89.3	174	17.9	2
K	248W	102	9.4	30	54.5	166	8.3	2
D	249E	110	6.7	78	22.4	258	16.1	4
D	249L	79	1.4	15	179.9	214	3.2	2
D	249M	101	9.6	50	4.5	163	1.2	2
D	249N	94	15.9	112	14.0	255	10.9	4
D	249P	56	4.0	138	21.0	119	0.2	2
D	249Y	110	8.8	41	28.3	170	6.6	2
T	250K	38	27.1	96	30.1	199	13.5	6
T	250M	78	11.0	165	7.4	47	6.6	4
T	250R	84	0.7	62	34.0	288	13.9	4
L	251F	125	6.0	64	47.6	160	16.6	10

WT*	Posição e Variantes*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
L	251H	59	11.6	46	5.6	187	22.7	2
L	251I	84	9.8	7	333.3	190	18.8	2
L	251W	95	2.9	0	na	161	17.3	2
M	252Y	61	5.8	964	27.9	62	46.1	4
I	253A	103	6.1	0	12.0	81	23.9	4
S	254A	99	20.1	7	733.0	139	11.2	4
S	254D	101	14.2	7	113.9	74	31.2	2
S	254E	102	3.8	6	107.9	72	35.2	2
S	254F	121	11.2	0	1087.4	206	14.4	6
S	254G	100	14.7	7	86.8	102	6.1	2
S	254H	108	20.0	0	74.3	85	22.0	4
S	254I	99	2.5	25	64.3	80	11.5	4
S	254K	109	14.8	9	77.2	137	6.1	2
S	254L	89	9.8	74	12.6	227	12.1	6
S	254M	89	11.9	0	212.1	248	13.4	6
S	254N	90	13.3	8	5.6	76	34.6	2
S	254P	78	17.7	3	141.4	75	25.2	2
S	254Q	84	12.6	9	121.2	74	25.2	2
S	254R	99	1.3	14	128.2	152	4.8	2
S	254T	54	51.9	32	34.7	75	12.1	2
S	254V	68	40.5	31	40.5	84	4.4	2
S	254W	98	6.0	0	116.1	188	7.7	6
S	254Y	117	9.4	0	129.1	211	15.7	6
R	255K	96	3.5	41	65.9	276	9.3	4
R	255N	84	17.7	27	162.7	81	18.1	2
T	256A	115	16.5	160	3.0	190	19.6	2
T	256D	97	5.3	544	10.6	86	23.2	6
T	258E	91	12.9	339	8.4	104	7.2	6
T	256F	119	3.3	5	435.0	128	26.6	2
T	256G	95	20.0	162	8.0	221	24.5	2
T	256H	103	6.3	28	6.1	91	11.9	2
T	256I	93	11.5	72	3.7	157	16.2	4
T	256K	100	6.7	31	20.6	92	20.2	2
T	256L	93	3.9	78	60.5	267	22.7	4
T	256M	122	17.4	35	78.9	200	14.8	10
T	256N	102	7.2	229	6.4	86	23.2	2
T	256P	109	11.8	190	6.1	260	11.8	8
T	256Q	100	17.2	64	14.2	152	11.3	4
T	256R	94	8.8	33	60.0	71	47.1	2
T	256S	103	5.3	169	3.1	101	15.9	2
T	256V	82	11.1	114	30.5	109	11.0	2
T	256W	96	8.5	14	84.5	170	14.4	4
T	256Y	97	7.2	68	18.6	127	18.0	2
P	257A	88	11.5	319	15.0	34	53.7	4
P	257J	54	16.4	1022	14.5	46	22.4	6
P	257M	26	11.0	635	19.1	48	48.4	4

WT*	Posição e variantes*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	257N	27	13.1	867	15.7	62	31.4	4
P	257S	28	28.8	184	6.8	46	30.1	4
P	257V	18	97.9	447	41.5	27	143.5	2
E	258D	115	7.0	361	20.5	110	9.6	4
T	260S	93	5.6	124	7.4	171	17.1	2
V	262L	61	2.9	525	15.1	30	48.0	2
V	264S	10	39.8	78	20.0	50	36.7	2
D	265H	8	118.9	79	36.1	81	0.5	2
D	265K	10	146.2	107	34.3	84	48.4	2
D	265S	9	106.3	66	28.9	103	18.9	2
D	265Y	3	7.6	33	88.8	62	21.5	2
S	267G	29	8.6	86	0.9	60	18.1	4
S	267H	0	48.4	86	16.6	47	41.1	4
S	267I	0	78.0	83	11.8	50	37.8	4
S	267K	0	73.3	102	14.2	28	47.1	4
H	268D	110	7.8	68	32.4	122	10.7	6
H	268E	110	8.3	126	17.8	100	8.4	8
H	268K	96	17.6	86	10.4	24	112.7	4
E	269N	23	74.0	92	17.0	30	69.4	4
E	269Q	47	3.6	98	3.5	22	82.8	4
D	270A	41	35.5	87	6.0	36	66.5	4
D	270G	0	102.2	106	16.5	37	21.8	4
D	270K	15	465.5	122	8.4	0	462.9	4
D	270M	49	19.2	81	5.2	25	606.9	4
D	270N	28	1185.2	94	8.2	34	103.7	4
P	271T	26	53.9	96	20.4	32	89.1	4
E	272H	73	13.6	157	23.0	53	34.8	2
E	272K	70	8.9	320	20.4	118	28.7	4
E	272L	78	21.1	129	3.9	71	3.1	2
E	272N	90	7.5	110	33.0	71	34.6	2
E	272R	50	2.1	351	3.3	102	1.2	2
V	279A	114	14.8	214	5.0	106	21.2	2
V	279D	87	12.1	367	0.3	98	8.5	2
V	279F	81	4.8	113	14.3	106	10.0	2
V	279G	98	2.4	256	11.6	108	18.0	2
V	279H	79	28.1	173	29.6	127	22.7	6
V	279I	101	1.8	83	1.8	100	21.0	2
V	279K	91	1.5	79	26.1	106	0.7	2
V	279L	96	3.0	78	13.9	100	5.7	2
V	279M	107	8.3	122	3.5	91	10.3	2
V	279N	102	32.0	204	19.5	85	50.2	6
V	279Q	85	28.3	181	8.0	139	8.1	6
V	279R	105	4.8	130	10.7	98	8.7	2
V	279S	94	29.8	242	18.3	122	16.7	6
V	279T	95	15.5	265	6.9	110	12.8	10
V	279W	68	24.8	162	22.8	125	10.5	6

WT ^a	Posição e variantes [*]	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
V	279Y	82	26.8	139	8.6	144	13.2	6
D	280A	111	44.9	55	50.1	135	28.7	2
D	280K	137	47.6	120	27.2	192	33.5	2
D	280T	108	na	60	12.6	122	8.7	4
E	283A	107	2.1	126	0.2	98	17.9	2
E	283D	84	8.4	110	4.0	92	10.3	2
E	283F	74	0.1	168	38.6	127	20.4	2
E	283G	93	3.1	137	4.4	135	8.5	2
E	283H	87	6.1	206	6.5	123	15.9	2
E	283I	106	1.9	143	5.6	126	12.3	2
E	283K	109	5.8	246	5.1	133	8.0	2
E	283L	92	3.1	126	1.3	120	0.1	2
E	283M	112	7.4	95	13.8	120	2.4	2
E	283N	102	3.8	119	7.4	135	23.4	6
E	283P	97	11.9	136	3.9	118	11.8	4
E	283Q	95	5.3	117	8.0	122	22.9	2
E	283R	102	0.9	282	8.1	144	16.7	2
E	283S	91	1.5	143	11.1	119	12.3	2
E	283T	103	3.2	143	12.4	108	11.0	2
E	283W	90	2.8	117	2.1	159	1.3	2
E	283Y	81	6.7	142	4.1	136	17.2	2
H	285N	93	2.6	202	19.8	113	21.1	4
N	286F	107	7.1	307	32.3	108	16.1	4
K	288N	110	8.7	162	13.2	118	18.1	4
K	288P	45	1.1	119	3.0	116	15.7	2
R	292A	114	2.9	85	67.5	74	21.1	4
R	292E	35	21.4	65	48.5	92	32.1	2
R	292F	73	16.4	64	7.6	101	8.3	2
R	292G	94	2.5	60	35.9	119	32.8	2
R	292I	79	1.5	56	23.6	108	3.7	2
R	292L	96	3.9	68	40.0	123	7.2	2
E	293S	68	7.4	101	23.0	98	0.1	2
E	293V	73	12.5	127	18.0	107	24.0	2
R	301W	5	105.4	119	18.1	49	31.1	4
S	304E	24	32.9	101	8.7	122	11.3	2
T	307A	87	4.4	233	14.5	115	6.5	4
T	307E	88	7.9	492	34.6	81	2.4	4
T	307M	82	5.3	302	23.7	150	6.5	4
Q	311A	106	2.4	139	7.0	89	28.3	2
Q	311D	111	8.0	38	22.2	83	13.6	2
Q	311E	102	1.7	46	17.7	78	0.7	2
Q	311F	89	6.9	64	7.5	212	20.7	2
Q	311G	98	1.9	58	21.5	92	9.8	2
Q	311I	87	8.2	497	9.8	236	11.3	8
Q	311K	80	13.4	165	5.5	170	9.3	6
Q	311L	107	6.7	186	9.2	191	8.1	4

WT*	Posição e	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	Variante*							
Q	311M	97	7.2	387	15.0	252	16.3	6
Q	311N	115	1.9	54	10.5	126	23.3	2
Q	311P	99	8.0	89	300.5	172	67.9	4
Q	311R	96	8.5	14	84.5	170	14.4	2
Q	311S	88	8.8	97	10.5	0	92.8	2
Q	311T	111	10.2	131	14.0	168	23.4	2
Q	311V	108	1.7	558	19.5	240	23.3	4
Q	311W	104	8.2	215	2.8	251	18.7	4
O	311Y	107	3.0	94	0.3	211	25.0	2
D	312P	97	1.4	546	16.1	148	11.6	2
L	314F	70	7.8	42	41.2	108	5.5	2
L	314I	83	13.0	86	22.7	184	14.2	4
L	314V	65	14.0	21	128.8	179	10.9	4
L	314W	79	11.0	5	80.2	190	2.0	4
L	314Y	87	13.6	84	81.4	238	3.2	4
N	315F	83	12.8	51	38.3	140	15.3	2
N	315K	108	3.5	88	10.2	148	8.2	2
N	315L	112	6.2	103	10.5	145	5.5	2
N	315P	62	10.2	14	289.1	231	9.1	4
N	315R	96	24.4	71	38.3	135	0.4	2
G	316F	54	26.0	34	72.4	81	10.0	2
G	316K	77	28.8	131	8.9	143	8.6	2
K	317P	54	21.5	145	1.8	190	4.7	4
K	317T	99	10.9	49	4.8	118	4.0	2
E	318N	123	7.2	216	7.5	120	7.0	4
E	318P	120	10.8	75	27.1	79	17.0	4
E	318T	109	5.7	304	56.8	118	10.5	4
E	318V	116	3.4	114	21.2	95	11.5	4
K	326W	74	17.9	93	5.7	214	8.7	2
A	327T	4	13.4	54	19.5	7	206.2	2
L	328V	76	3.2	101	6.3	58	13.8	4
P	329Y	53	41.5	107	13.2	25	90.3	4
A	330K	134	8.3	108	51.4	43	23.9	6
A	330R	103	5.5	121	39.4	31	38.6	6
I	332A	100	6.1	96	27.6	130	5.0	4
I	332D	143	3.1	78	33.7	151	11.5	6
I	332E	168	10.6	86	22.2	143	9.8	18
I	332F	97	14.5	108	3.4	149	11.0	4
I	332G	74	19.8	84	1.4	121	11.5	2
I	332H	82	4.3	129	1.1	150	11.5	2
J	332K	12	114.5	146	7.0	67	15.5	2
I	332L	94	0.9	127	2.6	154	5.1	2
I	332M	98	2.2	128	16.1	178	6.6	2
I	332N	95	15.3	92	16.1	137	5.1	4
I	332Q	99	8.4	98	7.8	148	8.5	6
I	332R	12	135.5	114	7.2	88	30.0	2

WT*	Posição e	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	Variante*							
I	332S	96	4.9	263	64.1	177	16.5	2
I	332T	112	7.5	100	5.3	124	4.5	4
I	332V	109	1.1	115	19.5	147	25.1	2
I	332W	81	16.8	123	3.7	150	9.7	2
I	332Y	93	13.1	93	12.3	152	5.3	2
A	339D	131	10.4	80	26.4	183	20.3	6
A	339E	100	0.4	75	4.2	91	0.1	2
A	339F	104	3.3	120	24.8	217	8.5	6
A	339G	107	3.7	67	6.5	118	0.3	2
A	339H	114	23.4	107	10.0	136	0.5	2
A	339I	136	14.6	80	30.6	206	22.8	6
A	339K	129	24.2	69	29.0	201	21.0	6
A	339L	97	8.7	83	9.8	104	8.7	2
A	339M	115	6.8	111	7.2	57	8.8	2
A	339N	110	6.3	146	3.5	240	17.5	4
A	339Q	128	15.8	102	19.8	138	11.0	6
A	339R	117	14.4	82	13.4	128	2.1	2
A	339S	124	13.0	95	23.6	170	22.5	6
A	339T	142	14.2	138	6.2	220	20.2	10
A	339W	92	13.4	156	11.4	243	10.6	6
A	339Y	97	17.0	92	19.8	265	21.9	10
G	341D	62	6.9	52	37.8	172	3.5	2
G	341E	73	6.9	50	16.1	161	3.8	2
G	341F	24	100.8	52	41.9	227	14.7	6
G	341H	54	9.3	65	63.7	245	16.0	6
G	341I	44	15.5	36	17.2	173	5.3	2
G	341K	77	3.9	67	18.9	161	2.6	2
G	341L	64	24.3	54	19.8	171	4.2	2
G	341M	55	39.8	79	9.7	232	11.1	6
G	341N	83	9.1	53	17.0	162	9.5	2
G	341P	35	47.2	127	9.9	228	16.2	6
G	341Q	59	18.7	72	1.0	166	7.7	2
G	341R	59	14.8	78	7.4	168	7.5	2
G	341S	65	26.6	55	12.2	224	9.2	6
G	341T	0	866.0	68	54.0	176	10.0	2
G	341V	65	171.0	69	15.0	213	9.6	4
G	341W	14	25.8	76	8.8	178	8.7	2
G	341Y	26	24.5	54	5.2	184	14.3	2
P	343A	75	18.6	110	37.7	143	5.9	2
P	343D	69	11.5	102	7.9	157	18.3	2
P	343E	65	34.9	345	6.4	157	17.6	2
P	343F	74	20.6	89	13.0	99	1058.4	4
P	343G	75	29.1	110	14.9	244	11.1	6
P	343H	78	33.8	191	1.2	159	3.1	2
P	343I	92	26.8	114	16.7	86	10.5	2
P	343K	74	37.7	232	2.6	185	9.1	2

WT*	Position and Variants*	ADCC	%CV	FcRn pH8.0	%CV	CDC	%CV	n=
P	343L	63	17.2	125	3.8	127	5.6	2
P	343M	60	35.1	83	13.7	134	18.7	4
P	343N	67	8.9	105	19.9	198	18.2	2
P	343Q	72	0.5	442	14.0	178	3.0	2
P	343R	94	1.3	198	10.4	179	9.9	4
P	343S	84	7.5	101	14.3	207	11.9	6
P	343T	69	4.2	128	16.1	151	4.4	2
P	343V	70	1.9	77	5.3	107	12.0	2
P	343W	48	22.3	56	6.4	184	17.9	2
P	343Y	63	9.9	112	7.2	270	14.4	6
Y	373A	56	3.7	33	15.0	121	28.7	2
Y	373D	74	17.7	74	32.5	227	10.2	6
Y	373E	41	23.6	106	20.8	151	19.5	2
Y	373F	76	2.8	110	12.7	117	1.0	2
Y	373G	39	21.6	38	25.4	75	39.7	2
Y	373H	79	34.2	100	13.9	169	8.2	4
Y	373I	65	9.0	73	14.0	154	6.4	2
Y	373K	76	12.2	70	2.9	246	6.9	6
Y	373L	76	21.4	66	17.0	189	6.2	6
Y	373M	78	1.2	53	25.8	115	3.2	2
Y	373N	64	21.5	61	23.3	148	12.1	2
Y	373Q	63	11.0	55	24.7	158	17.7	2
Y	373R	81	20.5	107	24.1	221	4.0	6
Y	373S	52	9.7	74	1.9	72	24.8	2
Y	373T	70	3.0	82	16.6	151	5.7	2
Y	373V	73	2.1	69	14.3	115	1.1	2
Y	373W	77	23.3	75	18.5	237	20.8	6
S	375R	69	10.9	595	15.9	166	1.1	2
D	376A	111	18.2	155	26.7	180	5.2	2
D	376E	85	12.3	82	29.5	98	13.5	2
D	376F	84	7.3	116	12.8	119	8.8	2
D	376G	73	3.1	135	3.9	164	0.6	2
D	376H	74	16.1	81	18.6	118	5.6	2
D	376I	100	14.1	144	7.2	101	50.5	10
D	376L	88	16.7	78	3.0	142	3.2	2
D	376M	86	21.6	129	1.4	91	15.1	2
D	376N	93	14.5	94	24.2	173	14.9	4
D	376P	85	15.1	203	12.9	153	19.6	6
D	376Q	88	5.0	116	22.7	176	19.8	4
D	376R	95	6.0	103	12.3	166	4.6	2
D	376S	85	21.4	134	27.3	209	25.3	2
D	376T	102	20.0	160	11.2	224	10.1	6
D	376V	112	8.1	251	15.0	210	11.1	12
D	376W	53	22.0	1	1719.9	89	34.8	2
D	376Y	78	4.2	53	25.8	98	39.9	2
I	377G	107	2.4	78	28.8	92	7.6	2

WT*	Posição	ADCC	%CV	FcRn	pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	e								
I	377K	117	10.0		167	27.7	80	11.3	4
J	377P	99	11.3		98	32.4	245	6.5	4
A	378D	98	6.6		163	13.9	19	91.9	6
A	378N	101	7.1		180	3.0	90	30.7	2
V	379N	96	19.5		74	39.0	204	5.5	4
V	379Q	113	3.2		85	27.3	218	4.1	4
V	379S	80	18.4		86	13.4	137	1.4	2
V	379T	101	16.6		109	14.9	237	2.2	4
E	380A	106	3.2		152	28.8	139	4.2	2
E	380D	102	2.1		73	44.2	78	0.7	2
E	380N	111	7.7		142	19.0	139	7.3	2
E	380S	110	8.5		230	24.1	131	0.1	2
E	380T	100	1.2		172	11.0	115	4.8	2
E	382A	110	6.0		103	7.8	82	29.6	2
E	382D	95	0.8		73	25.7	80	34.2	2
E	382F	121	13.8		222	16.6	67	28.2	6
E	382H	89	17.9		135	2.8	84	20.4	2
E	382I	109	6.4		131	6.2	218	5.4	6
E	382K	96	2.6		153	30.2	92	15.6	4
E	382L	93	16.5		126	11.1	156	7.7	2
E	382M	89	14.6		135	8.6	126	20.3	2
E	382N	99	1.1		137	5.2	69	4.5	2
E	382P	85	16.8		122	22.0	69	14.6	2
E	382Q	105	12.2		162	12.0	140	19.3	2
E	382R	104	8.4		165	2.7	85	3.0	4
E	382S	85	2.9		151	10.0	75	4.1	2
E	382T	89	10.2		172	5.2	109	30.0	2
E	382V	83	32.5		173	6.2	167	0.4	2
E	382W	97	10.5		172	5.2	73	1.9	2
E	382Y	105	11.5		188	14.5	78	3.3	4
G	385E	108	5.5		98	18.8	0	1586.3	2
G	385P	100	3.2		101	23.2	82	15.8	2
Q	386K	96	9.5		115	4.8	266	1.6	4
F	423N	107	8.5		158	2.1	48	27.5	2
S	424H	116	29.8		97	7.3	58	9.3	2
S	424M	91	3.5		60	60.0	75	14.4	2
S	424V	103	9.3		57	35.4	115	10.5	4
S	426D	105	24.3		65	10.0	318	12.7	4
S	426L	91	35.3		117	14.3	193	20.4	4
V	427N	108	5.5		192	5.9	64	23.1	2
H	429A	44	81.7		61	11.4	147	1.9	2
H	429F	70	11.1		77	16.6	288	12.8	4
H	429M	103	0.7		83	12.2	173	3.2	2
E	430A	100	8.3		179	6.6	204	7.1	2
E	430D	96	8.2		44	25.5	190	4.6	4
E	430F	111	13.0		218	19.4	203	6.1	2

WT*	Posição e	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
	Variante*							
E	430G	97	7.8	131	10.6	252	7.5	6
E	430H	91	7.7	192	8.0	227	4.2	6
E	430I	87	19.3	308	6.6	297	17.2	6
E	430K	66	9.5	131	12.6	203	16.0	4
E	430L	98	33.3	242	8.7	263	10.6	6
E	430M	102	16.1	195	8.7	227	4.6	6
E	430N	82	24.6	171	13.0	162	2.2	2
E	430P	103	13.1	86	16.7	254	23.5	8
E	430Q	79	8.3	320	12.8	97	4.9	8
E	430R	75	7.5	249	6.6	227	7.9	8
E	430S	88	30.1	183	3.4	221	18.5	2
E	430T	82	22.9	137	23.7	249	8.2	6
E	430V	79	35.6	281	7.0	276	17.5	6
E	430W	78	8.3	11	95.0	171	5.4	2
E	430Y	77	44.5	123	12.5	231	na	2
A	431H	81	44.0	151	11.5	236	na	2
A	431K	98	26.6	176	4.4	113	25.0	2
A	431P	62	12.0	29	13.8	210	8.0	2
L	432R	58	23.1	38	15.6	175	13.3	2
L	432S	58	55.4	70	3.6	124	0.2	2
N	434F	na	na	1008	1.4	na	na	4
N	434G	105	17.9	358	20.2	26	128.9	4
N	434H	90	12.9	855	20.4	57	9.1	6
N	434I	81	9.3	6	725.4	73	8.9	2
N	434W	108	6.6	1335	18.8	138	1.7	2
N	434Y	108	7.7	1615	38.8	281	15.5	4
Y	436I	119	18.0	194	24.2	35	8.7	2
Y	436L	112	27.2	172	8.1	90	16.3	4
Y	436T	90	35.0	115	7.2	48	20.3	2
Q	438G	93	32.1	98	14.4	68	26.2	2
Q	438K	99	31.7	169	12.3	116	43.0	2
Q	438L	94	32.5	200	14.7	190	5.5	4
Q	438T	96	37.4	126	9.5	56	26.8	2
Q	438W	93	32.5	164	8.2	126	1.7	2
K	439E	103	28.9	94	9.0	53	40.3	2
K	439H	91	37.3	99	0.9	77	17.8	2
K	439Q	90	38.2	74	0.9	64	26.5	2
S	440A	79	42.3	82	2.0	65	22.5	2
S	440D	82	18.4	72	4.7	99	9.4	2
S	440E	104	4.0	73	2.8	87	35.3	2
S	440F	111	16.1	87	8.2	73	18.5	2
S	440G	106	1.9	101	8.1	83	8.5	2
S	440H	108	2.1	110	2.1	96	18.3	2
S	440I	121	1.9	96	6.2	86	2.6	2
S	440K	116	16.7	132	7.8	71	26.4	4
S	440L	112	6.4	126	2.2	77	4.5	4

WT*	Posição e Variantes*	ADCC	%CV	FcRn pH6.0	%CV	CDC	%CV	n=
S	440M	84	51.0	80	8.2	81	20.8	2
S	440N	78	34.3	82	25.4	108	15.8	2
S	440Q	73	43.1	81	33.5	132	16.6	2
S	440R	91	11.3	88	16.2	85	29.8	2
S	440T	89	2.1	71	39.0	115	17.4	2
S	440V	85	11.3	88	18.7	110	16.4	2
S	440W	114	17.6	85	13.8	132	14.8	2
S	440Y	109	6.8	100	14.2	224	14.1	16
S	442K	80	51.9	138	4.5	100	11.1	2

Na = não disponível ou não realizado

*e.g., L235A indica uma Fc na qual a leucina presente no número 235 de aminoácido de Fc (de acordo com numeração de EU) foi substituída por um resíduo de alanina testado aqui: a região Fc é uma Fc de IgG1, o anticorpo é anticorpo anti-CD20

Tabela 10 Variantes de Combinação – ADCC

Variante	ADCC médio como % de peso	CV%	n=
Tipo selvagem	100	2.42	2
247A,339D	71.50	0.50	2
247F,339D	134.95	2.54	2
247H,339D	118.45	8.46	4
247I,339D	187.21	20.45	2
247L,339D	156.73	3.30	2
247T,339D	126.46	4.71	2
247Y,339D	121.93	4.58	2
247A,339H	125.35	0.60	2
247F,339H	101.54	4.53	2
247H,339H	114.24	4.91	2
247I,339H	126.94	5.22	2
247L,339H	120.92	2.44	2
247T,339H	97.96	5.71	2
247Y,339H	74.75	2.43	2
247A,339I	96.95	3.05	2
247F,339I	116.53	5.52	2
247H,339I	108.27	2.97	2
247I,339I	-4.07	-47.26	2
247L,339I	109.76	5.95	2
247T,339I	5.48	9.51	2
247Y,339I	100.84	9.58	2
247A,339K	86.90	13.51	2
247F,339K	105.85	10.11	2
247H,339K	97.59	7.67	2
247I,339K	97.41	14.89	2

Variante	ADCC médio como % de peso	CV%	n=
247L,339K	104.36	7.07	2
247T,339K	83.02	6.07	2
247Y,339K	95.79	3.69	2
332E	180.96	0.72	2
247A,339N	83.60	9.91	2
247F,339N	100.38	8.95	2
247H,339N	86.70	7.62	2
247I,339N	119.62	13.07	2
247T,339N	114.38	4.83	4
247Y,339N	113.18	1.50	2
332E	187.19	9.53	2
247A,339Q	69.94	8.45	2
247F,339Q	130.42	2.35	2
247H,339Q	138.96	1.32	2
247I,339Q	146.44	2.27	2
247L,339Q	140.50	4.58	2
247T,339Q	119.70	4.03	2
247Y,339Q	109.40	2.24	2
247A,339R	68.57	8.33	2
247F,339R	114.38	11.85	2
247H,339R	105.46	9.89	2
247I,339R	124.96	16.31	2
247L,339R	119.77	12.03	2
247T,339R	109.42	12.17	2
247Y,339R	98.58	13.09	2
247L,339T	148.48	7.08	4

wt = tipo selvagem

CV% =

n = número de amostras medidas e usadas para cálculo de média

Tabela 11 Variantes de Combinação com realçamento de ADCC

Variante Fc	ADCC EC50 (ng/ml)
Tipo selvagem	6.8
247L	2.2
330K	3.1
332E	1.5
339T	3.8
247L, 330K	1.5
247L, 332E	0.73
247L, 339T	2.0
330K, 332E	0.73
330K, 339T	2.0

332E, 339T	1.0
247L, 332E, 339T	0.75
247L, 330K, 332E	0.25
247L, 330K, 339T	1.5
330K, 332E, 339T	0.25
247L, 330K, 332E, 339T	0.25

- Atividades de ADCC foram calculadas a partir de curvas de titulação

Tabela 12 Variantes de Combinação

Mutação	ADCC	CV%	FcRn6.0	CV%	CDC	CV%	n=
Tipo selvagem	100		100		100		
247H339D	118	8.5	N/D	N/D	N/D	N/D	4
247L251F330R332E	184	13.3	50	5.9	43	1.3	2
247L251F376I	77	29.7	61	8.7	124	11.3	2
247L332E	168	7.3	78	4.9	65	6.2	6
247L332E376I	137	8.1	74	8.0	76	4.3	4
247T338N	114	4.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
251F332E	147	12.4	72	2.2	196	2.6	6
251F332E376I	136	15.9	68	5.0	160	10.9	4
251F376I	114	8.1	66	2.9	102	9.4	4
256P311I	107	0.2	268	1.2	357	10.0	2
256P314Y332E440Y	146	3.1	86	19.5	190	4.5	2
256P314Y440Y	112	22.6	79	3.0	226	9.4	2
256P332E	174	16.3	121	8.2	189	3.9	4
256P332E440Y	184	25.4	117	6.5	230	10.0	2
256P430Q	109	2.6	150	5.3	354	3.3	4
256P434H	105	1.2	342	3.1	299	2.9	2
256P440Y	189	19.7	122	0.7	247	26.6	2
257I311I	52	7.7	409	3.9	61	6.7	2
257I311I434H	48	12.2	553	4.9	75	8.8	6
257I430Q	26	8.1	304	0.6	55	12.9	4
257I434H	87	7.0	472	6.3	61	14.0	2
268D332E	197	12.4	92	13.7	128	4.1	4
268E332E	178	5.3	88	2.0	160	4.7	4
272R279L	56	0.2	156	1.2	72	5.1	2
279A288N	107	3.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N311T318V	110	9.0	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318N	110	5.4	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318T	116	5.1	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318V	118	8.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A311T318T	110	7.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
288N311T318T	115	9.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
311T318T	107	5.3	N/D	N/D	N/D	N/D	4
314Y332E440Y	156	5.4	82	0.9	155	0.0	2
314Y440Y	125	12.7	78	8.5	108	2.6	2
330K332D	179	2.9	88	8.3	43	0.3	2
330K332E	202	5.6	94	0.0	42	1.0	2
330R332D	152	6.3	88	6.3	44	1.5	2
330R332E	161	4.3	94	2.1	59	4.0	4
332E376I	132	8.6	102	7.6	193	5.2	6
332E376V	139	1.9	132	3.5	261	8.6	6

392E440Y	203	13.0	94	5.7	159	5.9	4
343R345D	121	16.0	143	1.6	291	3.3	2
376V430Q	92	1.5	212	4.2	256	12.2	4
376V430R	84	2.7	188	9.1	191	1.0	2
376V434H	97	3.3	382	3.3	95	6.1	4

Tabela 13 Variantes de Combinação

Mutação	FcRn6.0	CV%	n=
Tipo selvagem	100		
258D272R	382.8	8.2	2
258D283R	411.1	3.7	2
258D286F	445.0	1.7	2
258D307E	237.1	4.8	2
258D311I	522.0	7.0	2
258D376V	416.1	4.3	2
272R283R	439.3	21.7	2
272R286F	338.4	8.9	2
272R311I	396.1	14.4	2
272R376V	368.7	8.1	2
279D307E	522.4	8.8	2
283R307E	400.2	9.1	2
283R311I	531.3	6.1	2
283R376V	474.8	1.1	2
286F307E	431.2	3.8	2
286F311I	412.3	0.0	2
286F376V	348.9	1.5	2
307E376V	480.1	4.3	2
311I376V	413.5	39.1	2

Exemplo 2 – Caracterização de Atividade de CDC de Variantes

[0262] Este exemplo descreve como atividade de CDC de várias regiões Fc variantes é determinada.

[0263] Este ensaio é realizado usando complemento humano (Quidel Corp., cat#AI 13) em célula 15 Ramos (RA #1) (ATCC Catalog No. CRL-1596). Células Ramos são cultivadas em meios Gibco RPMI1640 contendo 10% de FBS a 37 °C e 5% de CO₂. No dia antes do ensaio, células são semeadas a 1 x 10⁶ células em um frasco T175. No dia seguinte, as células são resuspensas para 3,57 x 10⁵ células/ml em RPMI1640 sem vermelho de fenol contendo 1% de FBS. Distribuir 70 µl de células por poço para uma placa de fundo plano Costar 3917. Para curva de titulação, IgG com uma região Fc variante é preparado em uma diluição em série de 3 vezes em meios RPMI1640. Para ensaio de seleção de biblioteca de ponto único, variante de IgG transientemente expressa em sobrenadante de cultura é

normalizada para 1 µg/ml em meios simulados. Trinta microlitros de IgG variante (i.e., concentração final de 200 ng/ml) e 50 µl de complemento humano (Qidel Corp., cat#A113) diluídos 1:5 em RPMI 1640 + 1% de FBS são adicionados à célula alvo e misturados bem por pipetagem suave. As placas são incubadas a 37 °C na presença de 5% de CO₂ por 1,5 horas. Depois de adição de 15 µl/poço de Azul de Alamar (Serotec, cat#BUF 12B) a incubação continua durante a noite. Então o sinal fluorescente é medido por leitor de multimarca EnVision 2100 de PerkinElmer com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm.

ii. Análise de Dados

[0264] Todos os ensaio de ponto único são realizados em duplicata. Cada placa de ensaio contém controles para lise espontânea de célula alvo por complemento humano na ausência de IgG e lise máxima de célula alvo na presença de 1% de Triton X-100. Três controles tipo selvagem são incluídos em cada placa de ensaio e é calculada a média do sinal de ensaio de CDC. O valor de fundo, obtido a partir do controle de lise espontânea, é subtraído de cada amostra. O valor de fundo, obtido a partir da IgG diluída, é subtraído de cada amostra. Os dados são convertidos de sinais de fluorescência para porcentagem de lise específica baseado nos controles de lise espontânea e máxima. A porcentagem de lise específica é calculada a partir da seguinte equação: porcentagem de lise específica = (sinal de fluorescência experimental – sinal espontâneo)/ (sinal de lise máxima – sinal espontâneo) X 100. A porcentagem da atividade de variante de Fc sobre a média de três controles tipo selvagem é então calculada. É calculada a média da porcentagem das atividades sobre tipo selvagem para placas de ensaio duplicadas e o desvio padrão entre placas individuais de ensaio é calculado.

Exemplo 3 – Caracterização de Ligação com FcRn

[0265] Este Exemplo descreve ensaios para ligação de receptor neonatal de Fc (FcRn) a IgG com uma região Fc variante.

[0266] Uma placa ELISA de 96-poços de fundo U é revestida (Costar) com 50 µl/poço de 2 µg/ml de Neutraavidin (Pierce Biotechnology, Cat#3 1000) em 50 mM de tampão de Carbonato (pH 9,3) a 4 °C durante a noite. NeutraAvidina não ligada é

removida da placa e a placa é lavada três vezes com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20). Cinquenta microlitros de FcRn solúvel marcado com biotina a 2,5 µg/ml em PBS são aplicados por poço e incubados a temperatura ambiente por 1 hr. Então 75 µl de tampão bloqueador de caseína (Pierce Biotechnology, Cat#37528) são adicionados à placa por 1 hora. A placa de ELISA é então lavada com PBST e incubada com 50 µl/poço de IgG variante. Para a curva de titulação, IgG a ser testada é preparada por uma diluição em série de 3 vezes em tampão de ligação de FcRn (100 mM de NaPO₄, 0,05% de Tween-20, opcionalmente em diferentes pHs (de 6,0 a 7,4). Para seleção de ponto único, IgG variante transiente expressa em sobrenadante de cultura é normalizada para uma concentração final de 50 ng/ml e pH ajustado para 6,0 com tampão de ligação de FcRn. Nas etapas seguintes, tampão de ligação de FcRn em pH correspondente é usado para lavar a placa e para diluir reagentes. A reação de ligação é realizada em temperatura ambiente por 1 hr. Depois de três lavagens, IgG ligada é detectada por conjugado de Fab anti-humano (Fab')₂ de cabra-HRP por 1 hr. Atividade de HRP é desenvolvida em substrato de HRP de Pierce (Turbo TMB-ELISA, Cat#34022) por 5-30 minutos. A reação é parada por adição de 50 µl de 2 M de H₂SO₄ e a absorbância em 540 nm é lida com um leitor de VMAX de microplaca (Molecular Devices).

Exemplo 4 – Terapia Humana de variante de Fc de anti-CD20-I332E

[0267] Estudos in vitro e modelos de tumor (Clynes RA, et al. Nat Med. 6:443 (2000)) fornecem evidência de que ADCC desempenha um papel nos efeitos anti-tumor de anticorpos anti-CD20, tal como RITUXAN. Pacientes humanos podem ser tratados com anticorpos de variante de Fc de anti-CD20-I332E ou RITUXAN, de uma maneira similar àquela descrita em Cartron et al., Blood 99:754 (2002). Por exemplo, pacientes apresentando doença de estágio II a IV de acordo com a classificação Ann-Arbor, tendo pelo menos um sítio de doença mensurável, e baixa carga de tumor de acordo com os critérios de GELF, poderiam ser tratados com um total de quatro doses de aproximadamente 375 mg/m² de uma variante de Fc de anti-CD20 ou com RITUXAN administrado por infusão intravenosa (dias 1, 8, 15, e 22). O ponto final de eficácia primária é a taxa de resposta objetiva, i.e., a proporção de pacientes

atingindo ou remissão completa (CR), CR não confirmada (Cru), ou resposta parcial (PR) de acordo com critérios recentemente propostos por um comitê especialista internacional. Resposta clínica pode ser avaliada em mês dois (M2). Pacientes também pode ser avaliados para progressão em 1 ano (M12).

[0268] As taxas de resposta objetiva em M2 e M12 para pacientes tratados com RITUXAN ou variante de Fc de anti-CD20 podem ser comparadas de forma que as melhoradas atividades de ADCC fornecidas por uma variante de Fc possam ser quantificadas. Este mesmo exemplo poderia ser repetido com outras variantes de anti-CD20 (veja, e.g., Tabelas 1-10 neste lugar).

[0269] Adicionalmente, a realçada potência das variantes pode permitir diferentes rotas de administração, injeções menos freqüentes, e/ou administração de doses menores. Todas as publicações e patentes mencionadas no relatório acima. Várias modificações e variações do método descrito e sistema da invenção serão perceptíveis por aqueles versados na arte sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com formas de realização preferidas específicas, a invenção como reivindicado não deve ser indevidamente limitada a tais formas de realização específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que são óbvias para aqueles versados em química, e biologia molecular ou campos relacionados são pretendidas para estarem dentro do escopo das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-CD20, caracterizado pelo fato de compreender:
 - a) sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve consistindo de SEQ ID NO: 13;
 - b) sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada consistindo de SEQ ID NO: 14; e
 - c) variante de uma região Fc originário em que a região Fc originário é uma região IgG1 Fc humana e em que a região Fc variante compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo consistindo de 247I/339Q e 247I/339D.
2. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região Fc originário é uma região IgG1 Fc humana nativa.
3. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a variante de Fc é 247I/339Q.
4. Anticorpo anti-CD20 de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a variante de Fc é 247I/339D.
5. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia leve consistindo de SEQ ID NO: 29 e uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada consistindo de SEQ ID NO: 31.
6. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve é codificada por uma sequência de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 30 e a cadeia pesada é codificada por uma sequência de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 32.
7. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de aminoácidos de cadeia leve consistindo de SEQ ID NO: 29 e uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada consistindo de SEQ ID NO: 33.
8. Anticorpo anti-CD20, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve é codificada por uma sequência de ácido nucleico

compreendendo SEQ ID NO: 30 e a cadeia pesada é codificada por uma sequência de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 34.

9. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo anti-CD20 tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de compreender ainda um portador farmacêuticamente aceitável.

FIG. 1

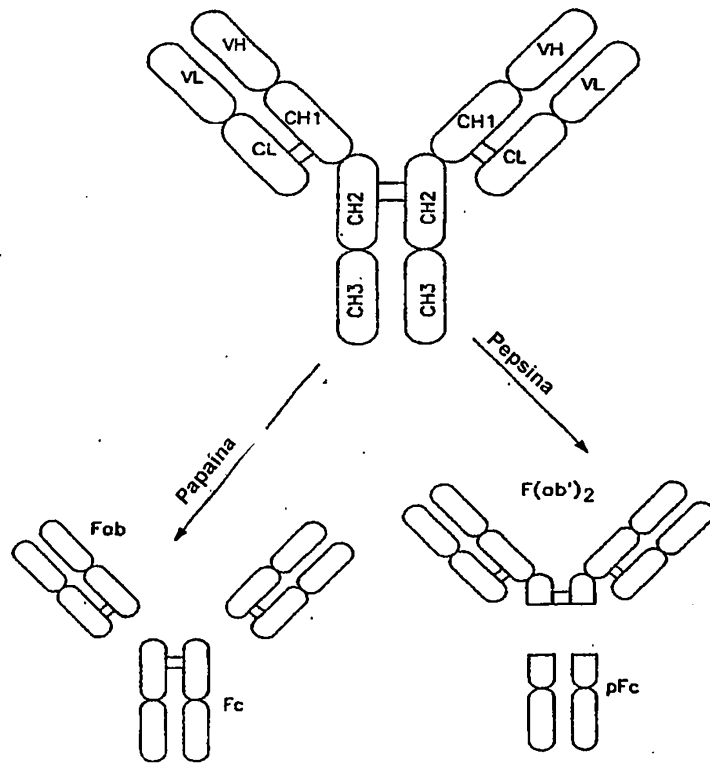


FIG. 2

humI9G1	230	PAP	280	DG
humI9G2		ELL		VE
humI9G3		GG		VH
humI9G4		PS		NA
murI9G1		VFL		KT
murI9G2A		FP		PR
murI9G2B		PK		EQ
murI9G3		PD		YN
		TL		ST
		MS		IR
		RT		RV
		EV		VS
		TC		VL
		CV		TV
		VD		LV
		SH		LD
		ED		HL
		DP		QD
		EV		WL
		QV		NG
		QF		KE
		QW		YK
		QY		CK
		QV		KV
		QW		SN
		QY		KA
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		GL
		QW		LP
		QY		GL
		QV		LP
		QW		GL
		QY		LP
		QV		

FIG. 3**A. CH2 parental (SEQ ID NO: 9)**

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

B. CH3 parental (SEQ ID NO: 10)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

C. Polipeptideo parental (alótipo f) (SEQ ID NO: 11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSDGSDGSDGSDGSDGSDG
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

D. Polipeptideo parental (alótipo a, z) (SEQ ID NO: 12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSDGSDGSDGSDGSDGSDG
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 4

A. (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASSSVP YIHWYQKPG QAPRLLIYAT
SALASGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE DFAVYYCQW LSNPPTF

B. (SEQ ID NO: 14)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGRTFT SYNMHWVRQM PGKGLEWMGA
IYPLTGDTSY NQKSKLQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYCARST
YVGGDWQFDV W

C. LCVR (II) de anti-CD20 (SEQ ID NO: 15)

QIVLSQSPAI LSASPGKVT MTCRASSSVS YIHWYQKPG SSPKPWIYAT
SNLAGVPPV FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQW TSNPPTF

D. HCVR (II) de anti-CD20 (SEQ ID NO: 16)

QVQLQQPGAE LVKAGASVKM SCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGA
IYPGNGDTSY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST
YVGGDWYFNV W

E. Anti-CD20 (I)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 17): RASSVVPYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 18): ATLAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 19): QQLSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 20): GRFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 21): AIYPLTGDTSYNQKSKL
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 22): STYVGGDWQFDV

Anti-CD20 (II)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 23): RASSVSYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 24): ATSNLAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 25): QQWTSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 26): GYTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 27): AIYPGNGDTSYNQKFKG
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 28): STYYGGDWYFNV

FIG. 5

A. SEQ ID NO: 29: seqüência de aminoácidos de cadeia leve completa de AME 133

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASSVPIYHWYQKPGQAPRLLIYATSALASGIPDR
 FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQWLNSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

- Região Constante está sublinhada

B. SEQ ID NO: 30: seqüência de ácidos nucléicos de cadeia leve completa de AME 133

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGC
 CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACATCCGCTCTGGCTTCTGGCATCCCAGACAGG
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTGGCTGAGTAACCCACCCACTTTTGGCCAGGGG
 ACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
 AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG
 AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

FIG. 6

A. SEQ ID NO: 31: seqüência de aminoácidos de cadeia pesada completa de AME 133 (variante 247I/339Q)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
NQSKLQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKQKGPQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- Região Constante está sublinhada; variantes estão em negrito

B. SEQ ID NO: 32: seqüência de ácidos nucléicos de cadeia pesada completa de AME 133 (variante 247I/339Q)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAGGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGAAAGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCCTAC
 AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTTCATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTACCCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTCAGTACC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAATCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAACAGAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

- Variantes estão em negrito e sublinhadas

FIG. 6

C. SEQ ID NO: 33: seqüência de aminoácidos de cadeia pesada completa de AME 133 (variante 247I/339D)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
NQSKLQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKDKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQOQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

- Região Constante está sublinhada; variantes estão em negrito

D. SEQ ID NO: 34: seqüência de ácidos nucléicos de cadeia pesada completa de AME 133 (variante 247I/339D)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAGGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCCTAC
 AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GGTTGACGGTG
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAGACAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAC
 GAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- Variantes estão em negrito e sublinhadas

FIG. 6

E. SEQ ID NO: 35: sequência de aminoácidos de cadeia pesada completa de variante (378D) de AME 133

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
 NQKSKLQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIDVEWESNGQPENNYKTPFPVLDSDGSFELYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- Região Constante está sublinhada; variante está em negrito

F. SEQ ID NO: 36: sequência de ácidos nucléicos de cadeia pesada completa de variante (378D) de AME 133

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAGGGTTCGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCCTAC
 AATCAGAAGTCGAACTCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
 ATCGAGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- Variante está em negrito e sublinhada