(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 014 619**

(51) Int. Cl.:

A61P 11/00	(2006.01)	***A61P 37/00***	(2006.01)
A61P 11/06	(2006.01)	***A61P 37/06***	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)	***A61P 37/08***	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	***A61P 1/04***	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)	***A61P 1/00***	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)	***A61P 19/04***	(2006.01)
A61P 7/00	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 35/02	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 20151751 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3674318**

(54) Título: **Variantes de Fc optimizadas**

(30) Prioridad:

20.03.2009 EP 09305250

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2025

(73) Titular/es:

LABORATOIRE FRANÇAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES (100.00%)
Tour W - 102 Terrasse Boieldieu, 19ème Étage
92800 Puteaux, FR

(72) Inventor/es:

BEHRENS, CHRISTIAN;
JORIEUX, SYLVIE;
KHARRAT, ABDELHAKIM;
BOUAYADI, KHALIL;
MONDON, PHILIPPE y
MONNET-MARS, CÉLINE

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de Fc optimizadas

Campo de la invención

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se refiere a una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc. Dicha variante presenta una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original y comprende al menos una modificación de aminoácido en su región Fc.

Descripción de la técnica relacionada

Los anticuerpos monoclonales se utilizan como agentes terapéuticos para tratar una variedad de afecciones que incluyen cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias crónicas, rechazo de trasplantes, enfermedades infecciosas y enfermedades cardiovasculares. Actualmente, hay más de veinte anticuerpos monoclonales o productos de fragmentos de anticuerpos monoclonales aprobados en el mercado y más de cuatrocientos en desarrollo clínico. A pesar de dicha aceptación y promesa, sigue existiendo una necesidad significativa de optimizar las propiedades estructurales y funcionales de los anticuerpos.

Uno de los aspectos críticos en el uso de anticuerpos monoclonales en terapia es su persistencia en la circulación sanguínea. La tasa de depuración de anticuerpos afecta directamente la eficacia de la terapia y, en consecuencia, la frecuencia y la cantidad de administración del fármaco, lo que puede provocar efectos adversos en el paciente y también aumentar los costes médicos.

La IgG es la clase de inmunoglobulina más prevalente en humanos y también la más utilizada en terapia. El mecanismo de homeostasis de la IgG se ha dilucidado a través de estudios relacionados con la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al feto o al neonato en roedores (Brambell, 1966, Lancet; 2(7473):1087-93.; Rodewald, 1976, J Cell Biol.;71(2):666-9;Jones et al., 1972, J Clin Invest., 51 (11):2916-27). En estudios tempranos, Brambell había postulado que existía un receptor para la transmisión maternofetal de IgG y que el mecanismo involucrado en la transferencia maternofetal de IgG y el catabolismo de IgG podrían ser el mismo o, al menos, estar muy estrechamente relacionados (Brambell, 1966, Lancet; 2(7473):1087-93).

Los estudios han descubierto que el transporte de IgG dentro y a través de las células polarizadas está mediado por la unión de la región Fc a un receptor de Fc de alta afinidad, llamado receptor Fc neonatal (FcRn). El FcRn es un heterodímero que comprende una cadena α transmembrana con homología estructural con los dominios extracelulares de la cadena α de las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, y una cadena ligera soluble que consiste en β_2-microglobulina (β_2m) (Simister y Mostov, 1989, Cold Spring Harb Symp Quant Biol.:54 Pt 1 :571-80). En los seres humanos, el FcRn se expresa en células placentarias, en células epiteliales intestinales, renales y bronquiales, en células endoteliales y en células hematopoyéticas, tales como macrófagos del intestino delgado, monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos (Zhu X et al., 2001, J Immunol.; 166:3266–76). FcRn se une a sus dos ligandos principales, IgG y albúmina sérica, de una manera dependiente del pH, con una unión eficiente a un pH de 6,0-6,5 y una liberación a un pH de 7,0-7,5 (Raghavan et al., 1995, Biochemistry, 34:14649-57).

El mecanismo propuesto para la protección de IgG del catabolismo es que las IgG se internalizan por pinocitosis no específica en los endosomas de las células endoteliales donde el pH bajo promueve la unión a FcRn (Ghetie y Ward, 1997, Nat. Biotechnol.,15: 637-40). Los complejos IgG-FcRn unidos se reciclan de nuevo a la superficie celular y se disocian al pH neutro del líquido extracelular, volviendo a la circulación en la sangre. Las IgG que no se unen a FcRn se desplazan hacia los lisosomas, donde son degradadas por las proteasas. Según el mecanismo de catabolismo dependiente de la concentración para la supervivencia de la IgG, a bajas concentraciones séricas de IgG, el receptor se uniría a todas las IgG endocitadas y las devolvería eficazmente a la circulación, lo que produciría una larga semivida de la IgG. Por el contrario, a altas concentraciones de IgG, el receptor está saturado de IgG y una fracción importante de la IgG no se une al receptor y se desplaza para ser degradada, lo que produce un catabolismo más rápido de la IgG no unida.

Varios experimentos de mutagénesis específica del sitio en la región Fc de las IgG de ratón han llevado a la identificación de ciertos residuos de aminoácidos críticos implicados en la interacción entre IgG y FcRn (Kim et al., 1994, Eur J Immunol.;24:2429-34; Kim et al., 1994, Eur J Immunol; 24:542-8; Medesan et al., 1996, Eur J Immunol.;26:2533-6; Medesan et al., 1997, J Immunol.;158 : 2211-7). Estos estudios y estudios de comparación de secuencias encontraron que la isoleucina en la posición 253, la histidina en la posición 310 y la histidina en la posición 435 (según la numeración de Kabat, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1991))), están altamente conservados en las IgG humanas y de roedores, lo que sugiere su importancia en la unión de IgG-FcRn. Estos residuos de aminoácidos se encuentran en la interfaz de los dominios CH2-CH3 y el mapeo del sitio funcional a estos residuos es consistente con la estructura cristalográfica de rayos X del FcRn de rata complejado con Fc de rata (Burmeister et al, 1994, Nature; 372(6504):379-83).

Ghetie et al. (1997, Nat. Biotechnol; 15:637-40) mutagenizaron aleatoriamente las posiciones 252, 254 y 256 de un fragmento de bisagra-Fc de IgG1 de ratón. Un mutante mostró una afinidad tres veces y media mayor por el FcRn de ratón y una semivida aproximadamente un 23 % o un 65 % más larga en dos cepas de ratón, respectivamente, en comparación con la del tipo salvaje.

Kim et al. (1999, Eur J Immunol; 29:2819-25) mutagenizaron la IgG1 humana mediante sustituciones de aminoácidos en la posición 253, la posición 310 o la posición 435 de la región Fc. Descubrieron que los fragmentos de bisagra-Fc mutantes tienen semividas séricas reducidas en ratones en comparación con el fragmento de bisagra-Fc de la IgG1 de tipo salvaje, y concluyeron que Ile253, His310 e His435 desempeñan un papel central en la regulación de la semivida sérica de la IgG.

Hornick et al. (2000, J. Nucl. Med., 41:355-62)) demostraron que una única sustitución de aminoácido en la posición 253 de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano quimérico acelera la depuración en ratones y mejora la inmunogammagrafía de tumores sólidos.

Shields et al. (2001, J Biol Chem; 276:6591-604)) utilizaron mutagénesis de barrido de alanina para alterar residuos en la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano y a continuación evaluaron la unión a FcRn humano. Las posiciones que anularon eficazmente la unión a FcRn cuando se cambiaron a alanina incluyen I253, S254, H435 e Y436. Otras posiciones mostraron una reducción menos pronunciada en la unión de la siguiente manera: E233-G236, R255, K288, L309, S415 y H433. Varias posiciones de aminoácidos exhibieron una mejora en la unión a FcRn cuando se cambiaron a alanina; entre estas, se destacan P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, E380, E382, S424 y N434. Muchas otras posiciones de aminoácidos mostraron una ligera mejora (D265, N286, V303, K360, Q362 y A378) o ningún cambio (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444 y K447) en la unión de FcRn.

La aditividad más pronunciada se encontró para las variantes de combinación con una unión mejorada a FcRn. A pH 6,0, la variante E380A/N434A mostró una unión más de 8 veces mejor a FcRn, en relación con la IgG1 nativa, en comparación con 2 veces para E380A y 3,5 veces para N434A. La adición de T307A a esto produjo una mejora de 12 veces en la unión en relación con la IgG1 nativa.

Dall'Acqua et al. (2002, J. Immunology;169:5171-80) describieron mutagénesis aleatoria y cribado de bibliotecas de presentación en fagos de fragmentos bisagra-Fc de IgG1 humana contra FcRn de ratón. Describieron mutagénesis aleatoria de las posiciones 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434 y 436. Las principales mejoras en la estabilidad del complejo FcRn humano-IgG1 tiene lugar en la sustitución de residuos ubicados en una banda a través de la interfaz Fc-FcRn (M252, S254, T256, H433, N434 e Y436) y en menor medida en sustituciones de residuos en la periferia como V308, L309, Q311, G385, Q386, P387 y N389. La variante con mayor afinidad por el FcRn humano se obtuvo combinando las mutaciones M252Y/S254T/T256E y H433K/N434F/Y436H y mostró un aumento de 57 veces en la afinidad en relación con el IgG1 de tipo salvaje.

Hinton et al. (2004, J Biol Chem.;279:6213-6) describieron dos mutaciones, T250Q y M428L, que aumentaron la unión de la IgG2 humana al FcRn humano aproximadamente 3 y 7 veces, respectivamente. En combinación, estas dos mutaciones indujeron una capacidad de unión de la IgG2 28 veces mayor. Inyectados a monos rhesus para estudios farmacocinéticos, ambos mutantes de IgG2, M428L y T250Q/M428L, mostraron semividas aproximadamente 2 veces más largas que el anticuerpo de tipo salvaje.

Dall'Acqua et al. (2006, J Biol Chem; 281:23514-24) describieron una IgG1 anti-virus respiratorio sincitial humanizada cuya región Fc estaba mutada en las posiciones 252, 254 y 256 (M252Y/S254T/T256E). Estas mutaciones aumentan la unión al FcRn humano aproximadamente 10 veces a pH 6,0 mientras que permiten una liberación eficiente a pH 7,4 (Dall'Acqua et al., 2002, J Immunol.;169:5171-80). El comportamiento *in vivo* de dicha IgG1 humana mutada exhibió un aumento de casi 4 veces en la semivida sérica en el mono cynomolgus en comparación con la IgG1 de tipo salvaje.

Adicionalmente, diversas publicaciones describen procedimientos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican ya sea introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (Documento WO 97/43316; Patente de EE.UU. N° 5.869.046; Patente de EE.UU. N° 5.747.035; Documento WO 96/32478; Documento WO 91/14438) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn se conservan pero las afinidades por otros receptores Fc se han reducido en gran medida (Documento WO 99/43713) o fusionando con los dominios de unión a FcRn de los anticuerpos (Documento WO 00/09560; Patente de EE.UU. N° 4.703.039).

La Patente de EE.UU. No. 6.165.745 describe un procedimiento para producir un anticuerpo con una semivida biológica reducida mediante la introducción de una mutación en el segmento de ADN que codifica el anticuerpo. La mutación incluye una sustitución de aminoácidos en la posición 253, 310, 311, 433 o 434 del dominio bisagra Fc.

La Publicación PCT N.º WO 00/42072 divulga un polipéptido que comprende una región Fc variante con afinidad de

unión a FcRn alterada, polipéptido que comprende una modificación de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y 447 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de la EU (Kabat et al., op. cit.).

La publicación PCT N.º WO 02/060919 A2 divulga una IgG modificada que comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en relación con un dominio constante de IgG de tipo salvaje, en donde la IgG modificada tiene una semivida aumentada en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo salvaje, y en donde una o más modificaciones de aminoácidos están en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-435.

Todavía existe una necesidad en la técnica de nuevas variantes de Fc optimizadas.

Resumen de la invención

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc, variante que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido original y comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361 D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 3081/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y 230T/303A/322R/389T/404L/434S de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante de la invención.

En otra realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la variante de la invención.

En otra realización, la invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente.

En otra realización, la invención proporciona una célula huésped que contiene un vector descrito anteriormente.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para producir una variante de polipéptido que comprende cultivar la célula huésped descrita anteriormente de modo que se exprese el ácido nucleico.

En otra realización, la invención proporciona un medicamento que comprende una variante de la invención.

En otra realización, la invención proporciona el uso de una variante de la invención para la fabricación de un medicamento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra el vector fagémido pMG58 en el que se clonó el gen de Fc humano que codifica los residuos de aminoácidos 226-447 (índice EU como en Kabat) derivados de una cadena pesada de IgG1 humana (Fc226, SEQ n°1).
CVDE: parte C-terminal de la endonucleasa derivada de VMA1, VMA: subunidad de ATPasa vacuolar (*VMA*), CPIII: parte C-terminal de la proteína de la cápside pIII (o p3) del fago M13

Figura 2 muestra los procedimientos utilizados para la selección de variantes de Fc en fase sólida (2A) y en solución (2B). FcRn-biot se refiere a FcRn biotinilado y FcRn-p3 se refiere a la proteína de fusión FcRn-p3. El Fc-fago es el bacteriófago M13 que expresa una variante de Fc en su cápside. En la selección en fase sólida, los pocillos de las inmunoplacas se recubren con la proteína de fusión FcRn-p3 (Fc-Rn-p3) o con neutravidina seguida de FcRn-biot.

Figura 3 muestra el principio del ensayo ELISA de fagos realizado en variantes de Fc seleccionadas. El Fc-fago es un bacteriófago M13 que expresa una variante de Fc en su cápside. FcRn-p3 es la proteína de fusión FcRn-p3 que recubre los pocillos de las inmunoplacas. Anti-M13 se refiere al anticuerpo anti-M13 de ratón fusionado con peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizado para la detección ELISA.

Figura 4 muestra un histograma que representa para cada posición de aminoácido de Fc IgG1 el porcentaje de mutantes que comprenden una modificación en dicha posición. Coordenada X: número de aminoácido según índice EU como en Kabat de la posición mutada. Coordenada Y: porcentaje de variantes de Fc que contienen la posición mutada.

Figura 5a muestra el principio del ensayo ELISA dedicado a medir la afinidad de unión de las variantes de Fc por FcRn. FcRn-p3 es una proteína de fusión FcRn-p3 que recubre los pocillos de inmunoplacas. Fc es una variante de Fc que comprende la etiqueta V5 para la detección por ELISA. Anti-V5 es un anticuerpo anti-V5 fusionado a HRP. El anticuerpo se utiliza para la detección por ELISA.

Figura 5b muestra la curva dosis-efecto para Fc de tipo salvaje (redondas) y la variante Fc-H (cuadrados) obtenida mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: Concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido al polipéptido Fc.

Figura 5c muestra las curvas dosis-efecto para Fc de tipo salvaje (redondas) y la variante S3A_07 (cuadrados) obtenidas mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: Concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido al polipéptido Fc.

Figura 5d muestra las curvas dosis-efecto para Fc de tipo salvaje (redondas) y la variante S5A_41 (cuadrados) obtenidas mediante ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 1 en IV.1.a. Coordenada X: Concentración de polipéptido Fc. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido al polipéptido Fc.

Figura 6 muestra alineaciones de secuencias de IgG1 humana nativa que hacen referencia a las posiciones 216-447 (según el índice EU en Kabat) con las secuencias correspondientes de IgG2 humana (SEQ ID NO:14), IgG3 humana (SEQ ID NO:15) e IgG4 humana (SEQ ID NO:16). Las secuencias de IgG1 hacen referencia al alotipo G1m1,17 (SEQ ID NO:12) y al alotipo G1m3 (SEQ ID NO:13). El dominio "bisagra inferior-CH2-CH3" de IgG1 comienza en la posición 216 (ver flecha).

Figura 7 muestra los resultados de los ensayos ELISA que se realizaron para mostrar la afinidad de unión de la variante de Fc a FcRn a distintos pH (para más detalles, véase el Ejemplo 2, parte IV.2). El histograma representa para cada variante el valor de $DO_{450\ nm}$ medida para el ensayo ELISA realizado a pH = 6 (barras negras), a pH = 6,5 (barras blancas) o a pH = 7,4 (barras grises). El valor de $DO_{450\ nm}$ se correlaciona con la cantidad de FcRn inmovilizado unido a las variantes de Fc.

Figura 8a ilustra un mapa esquemático del vector de expresión que se utiliza para expresar anticuerpos IgG1 recombinantes que portan variantes de Fc como se describe en este documento. Los anticuerpos IgG1 recombinantes resultantes poseen especificidad de unión para el antígeno CD20. Como se muestra en la Figura 8a, el ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena pesada que porta las mutaciones descritas en la memoria descriptiva y en los ejemplos se inserta entre los sitios de clonación Apa1 y AscI presentes en el vector HKCD20-Opti-GA.

Figuras 8b y 8c muestran SDS-PAGE de variantes de IgG en condiciones no reductoras y condiciones reductoras, respectivamente.

(1) se refiere a IgG que comprende Fc de tipo salvaje; (2) se refiere a IgG que comprende la variante Fc-H; (3) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_69; (4) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_78; (5) se refiere a IgG que comprende la variante T5A_74; (6) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_74, (7) se refiere a IgG que comprende la variante C6A_60 y (8) se refiere a que comprende C6A_66.

Figura 9 muestra la curva dosis-efecto para las variantes de IgG ("1") y la IgG de tipo salvaje ("2") obtenida mediante el ensayo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 2, III.1 para caracterizar la unión de las variantes de IgG a FcRn. Coordenada X: Concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de FcRn unido a IgG.

Figura 10 muestra las curvas dosis-efecto obtenidas mediante ensayo ELISA para variantes de IgG con el fin de caracterizar su afinidad por FcγRIIIa. (1) se refiere a la curva obtenida para la variante C6A_66, (2) se refiere a la curva obtenida para Rituximab y (3) se refiere a las curvas obtenidas para las variantes C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60 y la IgG de tipo salvaje. El ensayo ELISA se realizó como se describe en el Ejemplo 2, en la parte IV.1.a. Coordenada X: Concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de FcγRIIIa unido a IgG.

Figura 11 ilustra la unión de varias IgG recombinantes a FcRn de Jurkat. Figura 11 muestra que se ha determinado la unión de Ritixan y de varias variantes a FcRn de Jurkat como se describe en la Sección de Materiales y Procedimientos anterior y se ha expresado como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI).

Figura 12 muestra las curvas dosis-efecto obtenidas en el ensayo ADCC para las variantes de IgG. (1) se refiere a la curva de la variante C6A_66, (2) se refiere a la curva de Rituximab y (3) se refiere a las curvas de LFB-R603, WT-IgG y variantes de IgG (a saber, variantes C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60). Coordenada X: Concentración de IgG. Coordenada Y: porcentaje de lisis celular.

Descripción detallada de la invención

Para que la solicitud pueda ser comprendida más completamente, a continuación se exponen varias definiciones. Dichas definiciones pretenden abarcar equivalentes gramaticales.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la numeración de los residuos en la región Fc es la de la cadena pesada de inmunoglobulina según el índice de la EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland (1991)).

El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano.

Por "polipéptido" o "proteína" como se utiliza en este documento se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

Por "aminoácido" como se utiliza en este documento se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier análogo no natural que pueda estar presente en una posición específica y definida.

Los aminoácidos de origen natural se pueden abreviar con el código de tres letras o con el código de una letra:

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
alanina	ala	A
arginina	arg	R
asparagina	asn	N
ácido aspártico	asp	D
asparagina o ácido aspártico	asx	B
cisteína	cys	C
ácido glutámico	glu	E
glutamina	gln	Q
glutamina o ácido glutámico	glx	Z
glicina	gly	G
histidina	his	H
isoleucina	ile	I
leucina	leu	L
lisina	lys	K
metionina	met	M
fenilalanina	phe	F
prolina	pro	P
serina	ser	S
treonina	thr	T
triptófano	try	W
tirosina	tyr	Y
valina	val	V

Por "posición" como se utiliza en el presente documento se entiende una ubicación en la secuencia de una proteína. Para la región Fc, las posiciones se numeran de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

Por "modificación de aminoácidos" en el presente documento se entiende un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Las "modificaciones de aminoácidos" que también se pueden denominar "cambios de aminoácidos" en el presente documento incluyen la sustitución, inserción y/o deleción de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en el presente documento se entiende el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución N434S se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que la asparagina en la posición 434 se reemplaza por serina. Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" como se usa en el presente documento se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido original. Por ejemplo, la inserción G>235-236 designa una inserción de glicina entre las posiciones 235 y 236. Por "deleción de aminoácidos" o "deleción" como se utiliza en este documento se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original. Por ejemplo, E294del designa la eliminación de ácido glutámico en la posición 294.

Por ejemplo, se utiliza preferentemente el siguiente formato de modificaciones: 434S, o N434S, significa que el aminoácido original en la posición 434, es decir, asparagina, se reemplaza por serina.

En caso de una combinación de sustituciones, el formato preferido es el siguiente: 259I/315D/434Y o V259I/N315D/N434Y. Esto significa que hay tres sustituciones en la variante, una en la posición 259, una en la posición 315 y una en la posición 434, y que el aminoácido en la posición 259 del polipéptido original, es decir, valina, se reemplaza por isoleucina, que el aminoácido en la posición 315 del polipéptido original, es decir, asparagina, se reemplaza por ácido aspártico y que el aminoácido en la posición 434 del polipéptido original, es decir, asparagina, se reemplaza por tirosina.

Por "región variable" como se utiliza en el presente documento se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes de Vκ, Vλ y/o VH que componen los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena pesada, kappa y lambda respectivamente. Las regiones variables comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones estructurales (FR).

Por "Fc" o "región Fc", como se utiliza en el presente documento, se hace referencia al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cγ2 y Cγ3 que son dominios CH2 y CH3, respectivamente para IgG) y la región de bisagra

inferior entre Cgamma2 (Cγ1) y Cgamma2 (Cγ2). La región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana se define en el presente documento como que comprende los residuos C226 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En el contexto de la IgG1 humana, la bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340 y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. La región Fc correspondiente de otras inmunoglobulinas se puede identificar mediante alineaciones de secuencias.

Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación. Por "polipéptido Fc" como se utiliza en el presente documento se entiende un polipéptido que comprende la totalidad o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, fusiones a Fc, Fc aislados, conjugados a Fc y fragmentos de Fc.

El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio. "Anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al menos (i) una región Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión derivado de una región variable de una inmunoglobulina. Dicho dominio polipeptídico de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana determinado o a un grupo de antígenos diana. Un dominio polipeptídico de unión que deriva de una región variable de una inmunoglobulina comprende una o más CDR. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, proteína de fusión a Fc que comprende al menos una región variable, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en el presente documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, proteínas de fusión de anticuerpos, conjugados de anticuerpos y fragmentos de cada uno, respectivamente.

Por "anticuerpo de longitud completa" o por "inmunoglobulina" como se utiliza en este documento se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes. "Anticuerpo de longitud completa" abarca anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos de longitud completa de tipo salvaje, anticuerpos de longitud completa quiméricos, anticuerpos de longitud completa humanizados, sin que la lista sea limitativa.

En la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, la estructura de los anticuerpos de longitud completa es generalmente un tetrámero. Dicho tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y llamas, los anticuerpos de longitud completa pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada que comprende un dominio variable unido a la región Fc.

La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (en adelante denominada "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es más significativa.

La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. recopilaron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Basándose en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en la CDR y la estructura y elaboraron una lista de las mismas (véase Sequences of Immunological Interest, 5.ª edición, publicación del NIH, n.º 91-3242, EA Kabatet al.)

En el caso de las inmunoglobulinas humanas, las cadenas ligeras se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, que incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases, que incluyen, pero sin limitación, IgM1 e IgM2. Por lo tanto, "isotipo" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

Por "IgG" como se utiliza en el presente documento se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están codificados sustancialmente por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En los seres humanos, la IgG comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, la IgG comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Las IgG de longitud completa son tetrámeros y consisten en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una pesada, cada cadena ligera comprende los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, Cγ1 (también llamado CH1), Cγ2 (también llamado CH2) y Cγ3 (también llamado CH3). En el contexto de la IgG1 humana, "CH1" se refiere a las posiciones 118-220, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340 y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice de la EU como en Kabat. La cadena pesada de IgG también comprende un dominio de bisagra que se refiere a las posiciones 221-236 en el caso de la IgG1.

Por "polipéptido original" como se utiliza en el presente documento se entiende un polipéptido no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural, una variante de un polipéptido de origen natural, una versión modificada genéticamente de un polipéptido de origen natural o un polipéptido sintético. El término polipéptido original puede referirse al propio polipéptido o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. El polipéptido original comprende una región Fc seleccionada del grupo de regiones Fc de tipo salvaje, sus fragmentos y sus mutantes. En consecuencia, el polipéptido original puede comprender opcionalmente modificaciones de aminoácidos preexistentes en su región Fc (es decir, un mutante de Fc) en comparación con las regiones de Fc de tipo salvaje.

Ventajosamente, el polipéptido original es un anticuerpo, una inmunoglobulina, un polipéptido de fusión a Fc, un conjugado a Fc, no siendo esta lista limitativa. Por consiguiente, por "inmunoglobulina original" como se utiliza en el presente documento se entiende un polipéptido de inmunoglobulina que se modifica para generar una inmunoglobulina variante, y por "anticuerpo original" como se utiliza en el presente documento se entiende un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe observarse que "anticuerpo original" incluye, pero sin limitación, anticuerpos comerciales conocidos, producidos de forma recombinante.

Como se utiliza en este documento , el término "al menos uno" es igual a "uno o más".

Por "polipéptido variante", "variante de polipéptido" o "variante" como se utiliza en este documento se entiende una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica original debido a al menos una modificación de aminoácido.

Variante puede referirse a variante de Fc, variante de polipéptido Fc, variante de proteína, variante de anticuerpo, variante de inmunoglobulina, variante de IgG, no siendo esta lista limitativa.

Por "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante" como se utiliza en el presente documento se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina original debido a al menos una modificación de aminoácidos. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido WT.

Los polipéptidos originales de interés son polipéptidos que comprenden una región Fc como se definió anteriormente. Preferiblemente, la variante tiene una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica original debido a al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. En consecuencia, una variante de interés comprende una variante Fc.

Por consiguiente, por "variante de Fc" o "Fc variante" como se utiliza en el presente documento se entiende una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc original debido a al menos una modificación de aminoácidos. Una variante de Fc puede ser una región de Fc aislada y fragmentos de la misma, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión de Fc y fragmentos de los mismos, no siendo la lista limitativa.

Por "variante de proteína" o "proteína variante" como se usa en el presente documento se entiende una proteína que difiere de una proteína original debido a al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo original debido a al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de IgG" o "IgG variante" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG original debido a al menos una modificación de aminoácidos. Preferiblemente, la variante tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con el polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 45 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 modificaciones de aminoácidos, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 modificaciones de aminoácidos.

La secuencia variante aquí descrita poseerá preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de identidad con su secuencia polipeptídica original, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de identidad.

Como se pretende en el presente documento, un polipéptido determinado que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de aminoácidos con un polipéptido de referencia posee al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de aminoácidos con dicho polipéptido de referencia.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. Por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos para una alineación óptima y se pueden descartar las secuencias no homólogas para fines de comparación. Para fines de comparación óptima, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede lograr con CLUSTAL W (versión 1.82) con los siguientes parámetros: (1) MODO DE CPU = ClustalW mp; (2) ALINEACIÓN = «completa»; (3) FORMATO DE SALIDA = «aln w/numéros»; (4) ORDEN DE SALIDA = «alineada»; (5) ALINEACIÓN DE COLORES = «no»; (6) KTUP (tamaño de palabra) = «predeterminado»; (7) LONGITUD DE

VENTANA = «predeterminada»; (8) TIPO DE PUNTUACIÓN = «porcentaje»; (9) TOPDIAG = « predeterminado »; (10) PAIRGAP = «predeterminado»; (11) ÁRBOL FILOGENÉTICO/TIPO DE ÁRBOL = «ninguno»; (12) MATRIZ = «predeterminado»; (13) ABERTURA DE ESPACIO = « predeterminado »; (14) ESPACIOS FINALES = « predeterminado »; (15) EXTENSIÓN DE ESPACIO = « predeterminado »; (16) DISTANCIAS DE ESPACIO = « predeterminado »; (17) TIPO DE ÁRBOL = « cladograma » y (18) DISTANCIAS DE GRAP DE ÁRBOL = « ocultar ».

En el presente documento, por "tipo salvaje o WT" se hace referencia a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas las variaciones alélicas. Una proteína, un polipéptido, un anticuerpo, una inmunoglobulina, una IgG, etc. de tipo salvaje tienen una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionalmente.

Por "FcRn" o "Receptor Fc neonatal" como se utiliza en el presente documento se entiende una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen FCRN. El FcRn puede proceder de cualquier organismo, incluidos, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se sabe en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados cadena pesada y cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen FCRN. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, FcRn o proteína FcRn se refiere al complejo de cadena α con beta-2-microglobulina. En los seres humanos, el gen que codifica FcRn se denomina FCGRT.

Por "mayor unión a FcRn" como se utiliza en el presente documento se entiende el aumento de la afinidad de unión, in vivo o in vitro, de la variante a FcRn, en comparación con el polipéptido original. La capacidad de la variante de polipéptido para unirse a un FcRn se puede evaluar in vitro mediante ELISA (Ejemplo 1 parte IV.1.a) o tecnología SPR (Ejemplo 1 parte IV.1.b). Las variantes que tienen una propiedad de unión mejorada para FcRn tienen con mayor frecuencia una retención sérica mejorada in vivo y, por lo tanto, una semivida aumentada.

Para aumentar la retención de la región Fc in vivo, el aumento en la afinidad de unión para FcRn debe tener lugar alrededor de pH 6, mientras que se mantiene una afinidad más baja alrededor de pH 7,4.

Aunque todavía están bajo estudio, se cree que las regiones Fc tienen una semivida más larga in vivo, porque la unión a FcRn a pH 6 permite el secuestro de regiones Fc en endosomas (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598).

El compartimento endosómico recicla entonces las regiones Fc a la superficie celular. Una vez que el compartimento se abre al espacio extracelular, el pH más alto, casi 7,4, induce la liberación de las regiones Fc de vuelta a la sangre. Por lo tanto, las modificaciones de aminoácidos en la región Fc que aumentarán la semivida de las regiones Fc in vivo aumentarán idealmente la unión a FcRn a un pH más bajo mientras que aún permiten la liberación de la región Fc a un pH más alto.

El término "semivida in vivo" como se utiliza en este documento se refiere a una semivida biológica de un polipéptido de interés en la circulación de un animal determinado y está representada por el tiempo requerido para que la mitad de la cantidad presente en la circulación del animal se elimine de la circulación y/o de otros tejidos en el animal.

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se basa en la identificación de modificaciones de aminoácidos de la región Fc, modificaciones que aumentan la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. Las modificaciones de aminoácidos de interés se han determinado generando dos bibliotecas de variantes de Fc mediante mutagénesis aleatoria y midiendo la propiedad de unión de dichas variantes por FcRn.

Por consiguiente, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se refiere a variantes de polipéptidos originales que comprenden una región Fc que muestran una mayor unión a FcRn en comparación con dichos polipéptidos originales.

Un polipéptido original de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, es un polipéptido que comprende una región Fc. Dicho polipéptido puede comprender una única cadena polipeptídica o varias cadenas polipeptídicas que no están unidas entre sí de forma covalente. Los polipéptidos originales incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, proteínas de fusión a Fc, conjugados de Fc, polipéptidos derivados de Fc, Fc aislado y fragmentos de los mismos. En consecuencia, dicho polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural, una variante de un polipéptido de origen natural, una versión modificada de un polipéptido de origen natural, un polipéptido sintético o un polipéptido que comprende un fragmento no proteínico. Una versión modificada de un polipéptido de origen natural es un polipéptido que no está codificado por un gen de origen natural. Por ejemplo, el polipéptido modificado puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

La región Fc del polipéptido original se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de IgG, fragmentos y mutantes de las mismas. En este documento, la región Fc de IgG corresponde al dominio "bisagra inferior"-CH2-CH3 (para IgG, CH2 y CH3 también se denominan dominios Cγ2 y Cγ3). La secuencia del dominio "bisagra inferior"-CH2-CH3 de la IgG1 humana de tipo salvaje es la secuencia de SEQ ID NO:1. En el contexto de IgG1 humana, la bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH2 se refiere a las posiciones

237-340 y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. Los dominios análogos para otras subclases de IgG se pueden determinar a partir de la alineación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas o fragmentos de cadena pesada de dichas subclases de IgG con la de la IgG1 humana.

Los fragmentos de la región Fc se definen como polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos derivados de una región Fc de tipo salvaje, preferiblemente del dominio "bisagra inferior-CH2-CH3" de una IgG de tipo salvaje. Dichos fragmentos tienen una constante de disociación para FcRn inferior a 1 microM según el ensayo SPR descrito en el Ejemplo 1 parte IV.1.).

Como se mencionó anteriormente, el polipéptido original puede comprender un mutante de Fc de tipo salvaje, es decir, una región Fc que ya comprende modificaciones de aminoácidos preexistentes tales como adiciones, inserciones y/o sustituciones, con la condición de que dicho mutante Fc tenga una constante de disociación para FcRn inferior a 1 microM de acuerdo con el ensayo SPR descrito en el Ejemplo 1 parte IV.1. y no sea una región Fc de tipo salvaje.

Por "polipéptido variante" o "variante" como se utiliza en este documento se entiende una secuencia polipeptídica que difiere de la de un polipéptido original debido a al menos una modificación de aminoácido.

El polipéptido variante muestra una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original correspondiente. En otras palabras, la afinidad de la variante por FcRn es mayor que la del polipéptido original. Dichas variantes son variantes optimizadas.

La afinidad de dichos polipéptidos por FcRn se puede evaluar mediante procedimientos bien conocidos de la técnica anterior. Por ejemplo, un experto en la materia puede determinar la constante de disociación (Kd) utilizando experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) como se ilustra en el Ejemplo 1 parte IV.1.b. de la presente solicitud. Si la variante tiene una Kd 1,1 veces inferior a la de su original correspondiente, entonces dicha variante es una variante optimizada.

Como alternativa, el experto en la materia puede realizar un ensayo ELISA apropiado. Un ensayo ELISA apropiado permite comparar la fuerza de unión de la variante y la del polipéptido original con FcRn, como se ilustra en el Ejemplo 1. Se comparan las señales específicas detectadas para la variante y el polipéptido original. La variante es una variante optimizada si su señal específica es al menos 1,2 veces más fuerte, más preferiblemente, al menos 3,2 veces más fuerte que la del polipéptido original (es decir, al menos tan buena como la variante de Fc que tiene la modificación de doble aminoácido T250Q/M428L).

En el Ejemplo 1 de la presente solicitud se ilustran ensayos ELISA apropiados. La afinidad de unión se puede determinar indistintamente evaluando los polipéptidos de longitud completa (véase el Ejemplo 2, parte III) o evaluando las regiones Fc aisladas de los mismos (véase el Ejemplo 1, parte IV).

Las variantes de polipéptidos de interés comprenden al menos una modificación de aminoácidos en su región Fc en comparación con el polipéptido original. Las modificaciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos.

Los solicitantes han demostrado que para obtener una variante de polipéptido que tenga una mayor unión a FcRn en comparación con su polipéptido original, dicha al menos una modificación de aminoácido debe introducirse en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En el presente documento, el "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano. Por ejemplo, las posiciones análogas para otras regiones Fc se pueden determinar a partir de la alineación de la secuencia de aminoácidos de dichas regiones Fc con el fragmento de cadena pesada de IgG1 humana que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 1. A modo ilustrativo, la Figura 6 representa la alineación de secuencias de fragmentos de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos que comprenden el dominio "bisagra inferior-CH2-CH3".

Por "al menos una modificación de aminoácidos" como se utiliza en el presente documento se entiende "una o más modificaciones". Se considera que la introducción de más de 20 modificaciones de aminoácidos en la región Fc puede perjudicar drásticamente sus actividades biológicas. En consecuencia, la variante de polipéptido tiene preferiblemente de 1 a 20 y más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos, en posiciones seleccionadas de la lista citada anteriormente. Por "1 a 20 modificaciones de aminoácidos" como se utiliza en el presente documento se engloban 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 modificaciones de aminoácidos. La secuencia de dicha variante de polipéptido posee preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de identidad con su

secuencia de polipéptido original.

Como se pretende en el presente documento, un polipéptido determinado que tiene al menos aproximadamente un 90 % de aminoácidos con un polipéptido de referencia posee al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de aminoácidos con dicho polipéptido de referencia.

Las variantes de Fc que muestran la afinidad de unión más alta para FcRn generalmente comprenden más de una modificación de aminoácido. Los resultados obtenidos del ensayo ELISA de fagos descrito en el ejemplo II muestran que las variantes optimizadas que comprenden más de una modificación de aminoácido pueden tener una señal específica de aproximadamente 3,2 veces a 30 veces más fuerte (ver tabla 2 y tabla 3) que el Fc de tipo salvaje, mientras que las variantes con una única modificación de aminoácido puntual (ver tabla 1) pueden tener una señal de aproximadamente 1,2 veces a 3,5 veces más fuerte que el Fc de tipo salvaje. Como se ilustra en la tabla 3, la señal de la variante optimizada puede ser de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10 veces más fuerte que la de Fc-H, que se refiere a la variante de Fc que tiene la modificación de doble aminoácido T250Q/M428L.

Por consiguiente, en una realización específica, dicha variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos seleccionadas de la lista que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Como se describe en la tabla 5 de la presente solicitud, las variantes de Fc que muestran la mayor afinidad de unión por FcRn pueden tener de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos.

Por consiguiente, en una realización adicional, los polipéptidos variantes pueden comprender de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Las modificaciones de aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo de deleciones y sustituciones.

Algunas posiciones de aminoácidos de la lista anterior, a saber, 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434, son posiciones clave. En otras palabras, es probable que las variantes de Fc que muestran una alta afinidad de unión por FcRn comprendan al menos una modificación de aminoácidos en dichas posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la variante de polipéptido comprende al menos una modificación de aminoácido en posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434 de la región Fc en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Entre las posiciones clave anteriores, la secuenciación de las variantes de Fc que muestran la unión más fuerte para FcRn ha demostrado que las posiciones de aminoácidos 230, 264, 307, 315, 330, 378 y 434 son las posiciones mutadas con mayor frecuencia. Por consiguiente, en otra realización, dicha al menos una modificación se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en 230, 264, 307, 315, 330, 378 y 434, más preferiblemente del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434 de la región Fc en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Como se mencionó anteriormente, la introducción de al menos dos modificaciones de aminoácidos puede mejorar notablemente la afinidad de unión de la variante Fc por FcRn en comparación con el Fc original.

Por consiguiente, en una realización alternativa, la variante de polipéptido comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:
(i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y
(ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334,

335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447,
de la región Fc en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

Por ejemplo, de acuerdo con dicha condición, si la modificación de aminoácido (i) tiene lugar en la posición 434, dicha al menos una modificación de aminoácido (ii) puede tener lugar en cualquier posición de la lista citada en (ii) excepto en la posición 434.

En otra realización, la variante de polipéptido comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:
(i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434; y
(ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización adicional, dicha variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones de aminoácidos:
(i) una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otra realización adicional dicha variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos que comprenden:
(i) una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 378 y 434; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización alternativa, la variante de polipéptido comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos en su región Fc. Por consiguiente, dichas al menos tres modificaciones de aminoácidos pueden comprender:
(i) dos modificaciones en dos posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y
(ii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447
de la región Fc en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización alternativa, la variante de polipéptido comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos tres modificaciones de aminoácidos:
(i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264, 315, 378 y 434;
(ii) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y
(iii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i), la modificación (ii) y la modificación (iii) no tengan lugar simultáneamente en las mismas posiciones de aminoácidos.

En otras realizaciones, la variante de polipéptido comprende al menos tres modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos tres modificaciones de aminoácidos:
(i) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378 y 434;
(ii) una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo de 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434; y
(iii) al menos una modificación en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i), la modificación (ii) y la modificación (iii) no tengan lugar simultáneamente en las mismas posiciones de aminoácidos.

Las modificaciones de aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en sustituciones y eliminaciones (deleciones) de aminoácidos.

Una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido original y comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En una realización alternativa, dicho polipéptido comprende al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Preferiblemente, dicha variante tiene de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos seleccionadas de las listas anteriores, en comparación con el polipéptido original. Tal como se utiliza en el presente documento, por "de 1 a 20 modificaciones" se entiende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 modificaciones.

En algunas realizaciones, dicha variante comprende de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En una realización alternativa, dicho polipéptido comprende de 3 a 6 modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 226G, 227L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Algunas modificaciones de aminoácidos de las listas anteriores son modificaciones clave. En otras palabras, es probable que las variantes de Fc que muestran una alta afinidad de unión a FcRn comprendan al menos una modificación de aminoácidos seleccionada de dichas modificaciones clave.

Por consiguiente, dicha variante de polipéptido puede comprender al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, dicha variante de polipéptido comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 264E, 315D, 378V, 378T, 434Y y 434S de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En una realización adicional, dicha variante de polipéptido comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378V, 378T, 434Y y 434S de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Como se mencionó anteriormente, la introducción de al menos dos modificaciones de aminoácidos puede mejorar notablemente la unión de las variantes de Fc a FcRn en comparación con los originales. Al menos una de dichas modificaciones puede seleccionarse de entre las modificaciones clave, es decir, del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S.

En una realización alternativa, dicha variante de polipéptido comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones
(i) una modificación seleccionada del grupo que consiste en 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315,317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447
de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En una realización adicional, dicha variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones
(i) una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226, 230, 241, 264, 307, 315, 330, 342, 362, 378, 382, 389, 396, 397, 421 y 434
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otra realización, dicha variante comprende al menos dos modificaciones de aminoácidos, comprendiendo dichas al menos dos modificaciones:
(i) una modificación de aminoácido seleccionada entre 378V, 378T, 434Y y 434S; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada entre 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 342R, 362R, 362E, 378V, 378T, 382V, 389T, 389K, 396L, 397M, 421T, 434Y y 434S, y más preferiblemente, entre 226G, 230S, 230T, 230L, 241L, 264E, 307P, 315D, 330V, 362R, 378V, 378T, 389T, 389K, 434Y y 434S.
de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que la modificación (i) no tenga lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

Por consiguiente, un objetivo adicional se refiere a una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido original y comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos en la región Fc.

Dicha al menos una combinación de modificaciones se selecciona del grupo que consiste en: 226G/330V, 230L/264E, 230L/378V, 230S/315D, 230S/434Y, 230T/378V, 241L/434S, 250A/434Y, 264E/378T, 305A/315D, 305A/330V, 305A/434Y, 307P/434Y, 315D/389T, 330V/382V, 330V/389T, 378V/421T, 389K/434Y, 389T/434Y, 396U434S, 230T/264E, 230T/315D, 230T/434S, 230T/434Y, 241L/307P, 264E/307P, 264E/396L, 315D/362R, 315D/382V, 362R/434Y, 378V/434Y, 382V/434Y, 226G/315D, 226G/434Y, 241L/378V, 307P/378V, 241L/264E, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, 330V/434Y y 315D/434Y de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Dicha variante puede comprender además al menos una modificación seleccionada del grupo de 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante comprende:
(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: 226G/330V, 230L/264E, 230L/378V, 230S/315D, 230S/434Y, 230T/378V, 241L/434S, 250A/434Y, 264E/378T, 305A/315D, 305A/330V, 305A/434Y, 307P/434Y, 315D/389T, 330V/382V, 330V/389T, 378V/421T, 389K/434Y, 389T/434Y, 396L/434S, 230T/264E, 230T/315D, 230T/434S, 230T/434Y, 241L/307P, 264E/307P, 264E/396L, 315D/362R, 315D/382V, 362R/434Y, 378V/434Y, 382V/434Y, 226G/315D, 226G/434Y, 241L/378V, 307P/378V, 241L/264E, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V, 330V/434Y y 315D/434Y; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que las modificaciones (i) no tengan lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otras realizaciones, dicha variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 250A/434Y, 307P/434Y, 230T/434S, 264E/396L, 378V/434Y, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V y 315D/434Y de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Dicha variante puede comprender además al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo de 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante comprende:
(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: 250A/434Y, 307P/434Y, 230T/434S, 264E/396L, 378V/434Y, 378V/434S, 264E/378V, 264E/434S, 315D/330V y 315D/434Y; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que las modificaciones (i) no tengan lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En algunas realizaciones, dicha variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
226G/315D/330V, 226G/315D/434Y, 226G/330V/434Y, 230U264E/378V, 230T/264E/378V, 230T/264E/434S, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/389T/434S, 241L/264E/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/307P, 241L/307P/378V, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 294del/307P/434Y, 264E/307P/378V, 264E/396L/434S, 264E/378V/434S, 305A/315D/330V, 305A/315D/434Y,

305A/330V/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/382V, 315D/330V/389T, 315D/378V/434Y, 315D/389T/434Y, 315D/362R/434Y, 315D/382V/434Y, 315D/330V/434Y 330V/382V/434Y, 330V/389T/434Y y 378V/383N/434Y de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Dicha variante puede comprender al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante comprende:
(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: 226G/315D/330V, 226G/315D/434Y, 226G/330V/434Y, 230U264E/378V, 230T/264E/378V, 230T/264E/434S, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/389T/434S, 241L/264E/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/307P, 241L/307P/378V, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 294del/307P/434Y, 264E/307P/378V, 264E/396L/434S, 264E/378V/434S, 305A/315D/330V, 305A/315D/434Y, 305A/330V/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/382V, 315D/330V/389T, 315D/389T/434Y, 315D/362R/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y, 315D/330V/434Y 330V/382V/434Y, 330V/389T/434Y y 378V/383N/434Y; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228L, 228R, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que las modificaciones (i) no tengan lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En otras realizaciones, dicha variante comprende al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/264E/434S, 230T/389T/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/434S, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 264E/378V/434S, 264E/396L/434S, 294del/307P/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

Dicha variante puede comprender además al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en 226G, 226Y, 227S, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 230A, 230Q, 231T, 231V, 233D, 234R, 239A, 241L, 241Y, 241R, 243L, 246R, 250A, 252L, 256N, 259I, 264A, 264E, 264M, 265G, 265N, 267N, 267R, 269D, 269G, 270N, 270E, 276S, 284L, 285Y, 288R, 289I, 290R, 290E, 291S, 291Q, 292W, 294del, 297D, 298G, 298N, 299M, 299A, 299K, 301C, 302A, 303A, 303I, 305A, 307P, 307A, 307N, 308I, 309P, 311R, 315D, 317R, 320T, 320E, 322R, 325S, 327V, 327T, 330V, 330T, 332V, 334E, 334R, 335A, 338R, 340E, 342R, 342E, 342K, 343S, 345Q, 345G, 347R, 350A, 352S, 354P, 355Q, 355G, 356N, 359A, 360N, 360R, 361D, 361S, 362R, 362E, 369A, 370R, 371D, 375A, 375G, 378V, 378T, 378S, 380Q, 382V, 382G, 383R, 383N, 384I, 384T, 385R, 386R, 386K, 387S, 387T, 389T, 389K, 389R, 390S, 392E, 392R, 393N, 394A, 395A, 395S, 396S, 396L, 397A, 397M, 398P, 399N, 400P, 401A, 401G, 403T, 404L, 408T, 411A, 412A, 414R, 415D, 415N, 416K, 416G, 418R, 418K, 418E, 419H, 420R, 421T, 421S, 421D, 422A, 424L, 426T, 428L, 433R, 433P, 434Y, 434S, 434H, 438R, 439R, 440R, 440N, 443R, 444F, 444P, 445S, 446A, 447E y 447N de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, una variante comprende:
(i) al menos una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: 226G/315D/434Y, 230S/315D/434Y, 230T/315D/434Y, 230T/264E/434S, 230T/389T/434S, 241L/264E/378V, 241L/264E/434S, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 264E/378T/396L, 264E/378V/416K, 264E/378V/434S, 264E/396L/434S, 294del/307P/434Y, 307P/378V/434Y, 315D/330V/434Y, 315D/378V/434Y, 315D/382V/434Y y 378V/383N/434Y; y
(ii) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 226G, 227L, 228R, 228L, 230S, 230T, 230L, 231T, 241L, 243L, 250A, 256N, 259I, 264E, 265G, 267R, 290E, 294del, 303A, 305A, 307P, 307A, 308I, 315D, 322R, 325S, 327V, 330V, 342R, 347R, 352S, 361D, 362R, 362E, 370R, 378V, 378T, 382V, 383N, 386R, 386K, 387T, 389T, 389K, 392R, 395A, 396L, 397M, 403T, 404L, 415N, 416K, 421T, 426T, 428L, 433R, 434Y, 434S y 439R

de la región Fc, en comparación con el polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat y con la condición de que las modificaciones (i) no tengan lugar en la misma posición de aminoácido que la modificación (ii).

En todas las realizaciones citadas anteriormente, dicha variante tiene preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido original.

En una realización alternativa, dicha variante comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 307A/315D/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 256N/378V/434Y, 315D/330V/361 D/378V/434Y, 315D/361 D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315 D/428 L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 294del/307P/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 308I/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y 230T/303A/322R/389T/404L/434S de la región Fc, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

En otra realización, dicha variante comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 256N/378V/434Y, 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y y 230S/315D/428L/434Y.

Un objetivo adicional es proporcionar variantes de polipéptidos con una mayor unión para FcRn en comparación con sus polipéptidos originales y que comprenden una variante de Fc seleccionada del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 307A/315D/382V/389T/434Y 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 315D/361 D/378V/434Y 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 256N/378V/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 294del/307P/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 308I/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 267R/307P/378V/421T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y 230T/303A/322R/389T/404L/434S, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. En algunas otras realizaciones, la variante de polipéptido con mayor unión para FcRn en comparación con su polipéptido original comprende una variante de Fc seleccionada del grupo que consiste en 256N/378V/434Y, 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y y 230S/315D/428L/434Y.

Para todas las variantes mencionadas anteriormente, la región Fc de sus polipéptidos originales puede derivar de las regiones Fc de las IgG de tipo salvaje (por ejemplo, "bisagra inferior-CH2-CH3") y fragmentos de las mismas. En una realización más preferida, la región Fc de los polipéptidos originales deriva de las subclases de IgG humanas, a saber, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En otra realización preferida, la región Fc de los polipéptidos originales se selecciona del grupo que consiste en la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (SEQ ID: NO1), la región Fc de IgG2 de tipo salvaje (SEQ ID: NO2), la región Fc de IgG3 de tipo salvaje (SEQ ID: NO3) y la región Fc de IgG4 de tipo salvaje (SEQ ID: NO4).

En este contexto, otro objetivo es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG1 en donde dicha variante de FC de IgG1 comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG1(SEQ ID NO:1) y muestra una mayor unión a FcRn en comparación con la Fc de IgG1 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG1 no sea SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

Otro objetivo es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG2 en donde dicha variante de Fc de IgG2 comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG2 (SEQ ID NO:2) y muestra una mayor unión a FcRn en comparación con la Fc de IgG2 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG2 no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

Un objetivo adicional es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG3 en donde dicha variante de Fc de IgG3 comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG3 (SEQ ID NO:3) y muestra una mayor unión a FcRn en comparación con la Fc de IgG3 de tipo salvaje, con la

condición de que la secuencia de dicha variante de Fc de IgG3 no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4.

Otro objeto es un polipéptido que comprende una variante de Fc de IgG4 en donde dicha variante de Fc de IgG4 comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje de Fc de IgG4 (SEQ ID NO:4) y muestra una mayor unión a FcRn en comparación con la Fc de IgG4 de tipo salvaje, con la condición de que la secuencia de dicha variante de IgG2 Fc no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:2.

En realizaciones preferidas, dicha al menos una modificación de aminoácidos comprendida en los polipéptidos variantes Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se selecciona del grupo de modificaciones de aminoácidos y combinaciones de modificaciones de aminoácidos que se describen anteriormente en la presente memoria descriptiva cuando se define en general la variante de un polipéptido que comprende una región Fc y que tiene una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original correspondiente.

Como se ha descrito anteriormente, una variante muestra una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original correspondiente. En una realización, las funciones efectoras y las demás propiedades de unión de dicha variante son similares a las del original correspondiente. Dicha variante puede no mostrar particularmente ningún cambio significativo en la unión a los receptores Fc-gamma o C1q en comparación con su polipéptido original.

En otra realización, dicha variante tiene una mayor unión a FcRn combinada con una o más funciones efectoras alteradas y/o unión a ligandos Fc (distintos de FcRn).

Como se ilustra en el Ejemplo 2, la variante puede tener una mayor unión a FcRn combinada con una unión inalterada a un FcyR, en particular a FcyRIIIa, actividad ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y actividad CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) en comparación con la variante polipeptídica. La variante también puede tener una mayor unión a FcRn combinada con actividades ADCC y CDC que son al menos similares a las de su polipéptido original. En algunos otros casos, la variante puede tener una mayor unión a FcRn combinada con al menos una actividad efectora reducida seleccionada entre ADCC y CDC en comparación con su polipéptido original.

Las actividades de ADCC y CDC pueden evaluarse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica anterior, tales como los descritos en el Ejemplo 2 partes IV.2 y IV.3 de la presente memoria descriptiva.

La unión a FcyR se puede evaluar mediante procedimientos convencionales, tales como el ensayo SPR o ELISA.

Un objetivo adicional es proporcionar variantes que opcionalmente comprenden modificaciones de aminoácidos adicionales que difieren de las citadas anteriormente con la condición de que las variantes resultantes tengan una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original.

Por consiguiente, las modificaciones de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc que se sabe que aumentan la afinidad de Fc por FcRn (véanse, por ejemplo, las referencias citadas en la parte de la presente solicitud dedicada a la descripción de la técnica relacionada).

Como alternativa, las modificaciones de Fc pueden combinarse con otras modificaciones de Fc, incluidas, pero sin limitación, modificaciones que alteran la función efectora o la interacción con uno o más ligandos de Fc. Como consecuencia, dichas variantes pueden mostrar una mayor unión a FcRn combinada con una unión alterada a un ligando de Fc (distinto de FcRn) o/y una función efectora alterada en comparación con el polipéptido original.

Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitación, FcyR (receptores Fcgamma), C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcyR virales. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los FcgammaR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136).

Por "función efectora" como se utiliza en el presente documento se entiende un evento bioquímico o celular que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero sin limitación, ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos), ADCP (fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento).

Las variantes abarcan cualquier polipéptido que comprende una región Fc y que muestra una mayor afinidad de unión para FcRn en comparación con su polipéptido original con la condición de que dicho polipéptido difiera de su polipéptido original debido a al menos una modificación de aminoácidos o una combinación de modificaciones de aminoácidos en la región Fc. Las modificaciones y las combinaciones de modificaciones de aminoácidos de interés son las descritas anteriormente al dar características generales de las variantes.

Las variantes (y por lo tanto los polipéptidos originales) incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, proteínas de fusión a Fc, conjugados a Fc, Fc aislado y sus fragmentos respectivamente. En particular, las variantes pueden ser una proteína de unión que comprende Fc. En otras palabras, las variantes comprenden (i) una variante de Fc y (ii) un

dominio de polipéptido de unión que es capaz de unirse específicamente a una molécula determinada.

En una realización, las variantes de polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste en variantes de proteína de fusión a Fc y variantes de conjugado a Fc. La proteína de fusión a Fc y los conjugados a Fc consisten en una región de Fc unida a un compañero. La región de Fc puede estar unida a su compañero con o sin un espaciador.

Una proteína de fusión a Fc es una proteína codificada por un único gen y comprende una proteína, un polipéptido o un péptido pequeño unido a una región Fc. Una proteína de fusión a Fc comprende opcionalmente un espaciador peptídico. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a regiones Fc para generar una fusión a Fc. Los compañeros de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de cualquier anticuerpo, un polipéptido derivado de una región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio proteico. En particular, la proteína de fusión a Fc puede ser una inmunoadhesina, es decir, una proteína similar a un anticuerpo que combina el dominio de unión de una proteína de "adhesión" heteróloga (es decir, receptor, ligando o enzima) con un fragmento del dominio constante de inmunoglobulina (es decir, una región Fc) (véase una revisión sobre inmunoadhesinas, Ashkenazi A, Chamow SM. 1997, Curr Opin Immunol.;9(2):195-200).

Los compañeros de fusión de péptidos pequeños pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular que esté implicado en la enfermedad.

Un conjugado a Fc resulta del acoplamiento químico de una región Fc con un compañero conjugado. El compañero conjugado puede ser proteínico o no proteínico. La reacción de acoplamiento generalmente utiliza grupos funcionales en la región Fc y en el compañero conjugado. Se conocen en la técnica diversos enlazadores que son apropiados para la síntesis de conjugados; por ejemplo, los enlazadores homofuncionales o heterobifuncionales son bien conocidos (véase, Pierce Chemical Company catalog, 2005-2006, sección técnica sobre reticulantes, páginas 321-350.

Los compañeros conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos terapéuticos, marcadores (por ejemplo, marcadores, véase más adelante), fármacos, agentes citotóxicos, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), toxinas y fragmentos activos de dichas toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen, pero no se limitan a, cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Un agente citotóxico puede ser cualquier radionucleido que pueda conjugarse directamente con la variante de Fc o secuestrarse mediante un agente quelante que esté unido covalentemente a la variante de Fc. En realizaciones adicionales, los compañeros conjugados pueden seleccionarse del grupo que consiste en caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina y duocarmicinas y análogos; (para estos últimos, véase US 200310050331).

Dichas variantes de interés pueden tener una mayor unión a FcRn a un pH reducido (por ejemplo, aproximadamente a un pH de 6), y una unión sustancialmente no modificada a un pH más elevado (por ejemplo, aproximadamente a un pH de 7,4). De particular interés son las variantes de proteína de fusión a Fc y conjugadas a Fc que muestran semividas in vivo aumentadas en comparación con los polipéptidos originales.

En una realización preferida, la variante de polipéptido es un anticuerpo variante de un anticuerpo original. El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio. "Anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al menos (i) una región Fc y (ii) un dominio de polipéptido de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. Dicho dominio de polipéptido de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana determinado o a un grupo de antígenos diana. Un dominio de polipéptido de unión que deriva de una región variable de una inmunoglobulina comprende al menos una o más CDR. En el presente documento, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, proteína de fusión a Fc que comprende al menos una región variable, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en el presente documento como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos completamente humanos. Los anticuerpos también abarcan proteínas de fusión de anticuerpos, conjugados de anticuerpos y fragmentos de cada uno respectivamente. En consecuencia, un anticuerpo variante comprende, en su región Fc, al menos una modificación de aminoácidos o una combinación de modificaciones citadas anteriormente que aumentan su afinidad de unión por FcRn en comparación con su anticuerpo original. De particular interés son las variantes de anticuerpos que muestran una mayor afinidad de unión por FcRn a un pH reducido (por ejemplo, aproximadamente a un pH de 6) y tienen una unión sustancialmente no modificada a un pH más elevado (por ejemplo, aproximadamente a un pH de 7,4). Además, de particular interés son las variantes de anticuerpos que tienen semividas in vivo aumentadas en comparación con los polipéptidos originales.

En una realización, se selecciona un anticuerpo variante del grupo que consiste en variantes de anticuerpos de longitud completa originales. Por "anticuerpo de longitud completa" en el presente documento se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes. El polipéptido original de una variante de anticuerpo de longitud completa puede ser un anticuerpo de tipo salvaje, un mutante de un anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo, que comprende modificaciones preexistentes), una versión modificada de un

anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano, véase más adelante), sin ser esta lista limitativa. La estructura de un anticuerpo de longitud completa es generalmente un tetrámero, excepto en algunos mamíferos, como las llamas y los camellos, en los que algunas inmunoglobulinas son dímeros. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (que típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa).

Ejemplos de anticuerpos de longitud completa son las inmunoglobulinas humanas que abarcan las clases IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

En realizaciones preferidas, dicha variante de anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo que consiste en variantes de IgG.

En realizaciones más preferidas, dicha variante de anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo que consiste en variantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas con la condición de que dicha secuencia de la región Fc de dicha variante no sea SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.

Dicha variante de IgG comprende una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con su IgG original, dichas una o más modificaciones o combinaciones de modificaciones de aminoácidos son aquellas descritas previamente en la presente memoria descriptiva cuando se definen en general las variantes de un polipéptido que comprende una región Fc y que tiene una mayor unión a FcRn en comparación con el polipéptido original correspondiente.

En otra realización, dicha variante de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en proteína de fusión a Fc que comprende un dominio polipeptídico de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. De particular interés son los anticuerpos que comprenden (a) una variante Fc y (b) uno de los siguientes dominios polipeptídicos de unión derivados de una región variable de una inmunoglobulina (es decir, que comprenden al menos una CDR): (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) regiones CDR aisladas, (v) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vi) moléculas Fv de cadena única (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno, (vii) Fv de cadena única biespecífico y (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica, no siendo esta lista limitativa.

En otra realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061).

En algunos casos, el scFv se puede unir a una región Fc de longitud completa (De Lorenzo et al., 2005, Carcinogenesis 26:1890-1895), y también puede incluir la región de bisagra o un fragmento de la misma.

En una realización, los anticuerpos se seleccionan del grupo de anticuerpos multiespecíficos, y en particular del grupo de anticuerpos biespecíficos que a veces se denominan "diacuerpos". Estos anticuerpos se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos se pueden fabricar de diversas maneras conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449), por ejemplo, se pueden preparar químicamente o derivar de hibridomas.

En algunas realizaciones, los componentes de andamiaje de las variantes de anticuerpos pueden ser una mezcla de diferentes especies. Dicha variante de anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente una o más regiones variables de un animal no humano, generalmente el ratón (o la rata, en algunos casos) y la o las regiones constantes de un ser humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a un anticuerpo humano excepto dentro de sus CDR. Las CDR, algunas o todas las cuales están codificadas por ácidos nucleicos originados en un organismo no humano, se injertan en la estructura de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018;Jones, 1986, Nature 321:522-525; Verhoeyen et al.1988, Science 239:1534-1536.

El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto comprenderá típicamente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse utilizando ratones con un sistema inmunológico modificado genéticamente (Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654).

Una variedad de técnicas y procedimientos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.) y las referencias citadas en el mismo).

Los procedimientos de humanización incluyenpero, sin limitación, los procedimientos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA. 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9; Presta et al., 1997, Cancer Nada. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8.

La humanización u otros procedimientos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir procedimientos de renovación de la superficie, como se describe, por ejemplo, en Roguska y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973.

En una realización, dicha variante de anticuerpo es un anticuerpo completamente humano con al menos una modificación de aminoácido como se describe en el presente documento. "Anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo que comprende completamente secuencias que se originan a partir de genes humanos. En algunos casos, estos pueden ser anticuerpos humanos que tienen la secuencia genética de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano con las modificaciones descritas en el presente documento. Alternativamente, los componentes del anticuerpo pueden ser humanos, pero no derivarse de un solo gen. Por lo tanto, por ejemplo, las CDR humanas de un anticuerpo se pueden combinar con secuencias, tales como secuencias de andamiaje, de uno o más anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede combinar una variedad de secuencias de línea germinal para formar un anticuerpo humano o un andamiaje humano (por ejemplo, para su uso en secuencias humanizadas o quiméricas como se describe anteriormente), así como Solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 11/022.289.

En ciertas realizaciones, la variante de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG quiméricas, IgG humanizadas e IgG completamente humanas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos descritas en el presente documento pueden modificarse para incluir una o más glicoformas modificadas genéticamente. Por "glicoforma modificada genéticamente" como se usa en el presente documento se entiende una composición de carbohidratos que está unida covalentemente al polipéptido que comprende la variante Fc, en donde dicha composición de carbohidratos difiere químicamente de la de un polipéptido original. Las glicoformas modificadas genéticamente pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero sin limitación, mejorar o reducir la función efectora. Las glicoformas modificadas genéticamente pueden unirse a cualquier aminoácido de la secuencia de la variante. En una realización preferida, dichas glicoformas están unidas a aminoácidos de la región Fc.

Las glicoformas modificadas genéticamente se pueden generar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; Patente de EE.UU. No. 6.602.684; Números de serie de EE. UU. 10/277.370; 10/113.929; WO 00/61739A1; WO 01/29246A1;WO 02/31140A1; WO 02/30954A1, WO 01/77181, (Tecnología Potelligent ® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb ® [Glycart Biotechnology AG, Zúrich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecantes que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, expresando la variante del anticuerpo en varios organismos o líneas celulares, modificados o no (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células de hibridoma de rata YB2/0), regulando enzimas implicadas en la vía de glicosilación (por ejemplo, FUT8 [α1,6-fucosiltransferasa] y/o β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando el/los carbohidrato(s) después de que se haya expresado la variante del anticuerpo.

Alternativamente, la glicoforma modificada genéticamente puede referirse a la variante de anticuerpo que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente. Como se sabe en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, que se analizan a continuación) o de la célula huésped o del organismo en el que se produce la proteína. A continuación se analizan sistemas de expresión particulares.

La glicosilación de polipéptidos es típicamente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tri-peptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tri-peptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de

aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación ligados a O). Para mayor facilidad, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en el anticuerpo es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

La eliminación de los restos de carbohidratos presentes en el anticuerpo de partida se puede lograr química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el polipéptido intacto. La desglicosilación química se describe en Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de los restos de carbohidratos en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como se describe en Thotakura et al, 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en sitios de glicosilación potenciales se puede prevenir mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe en Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

En algunas realizaciones, la variante de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG quiméricas, IgG humanizadas e IgG completamente humanas que comprenden glicoformas modificadas.

En una realización alternativa, la modificación covalente de las variantes de anticuerpo comprende la adición de uno o más marcadores. En algunos casos, estos se consideran fusiones de anticuerpos. El término "grupo de marcado" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo de marcado está acoplado al anticuerpo a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el posible impedimento estérico. En la técnica se conocen varios procedimientos para marcar proteínas y se pueden utilizar.

En general, los marcadores se dividen en una variedad de clases, dependiendo del ensayo o del procedimiento de diagnóstico en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos, etc.).

Las etiquetas específicas incluyen colorantes ópticos, incluidos, pero sin limitación, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo estos últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser "moléculas pequeñas" fluorescentes o proteínas fluorescentes.

En otra realización, las variantes de anticuerpo pueden fusionarse o conjugarse con una proteína o una molécula pequeña que no se utilizan como un grupo de marcado como se describió anteriormente. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a un anticuerpo. Los compañeros de fusión de proteínas pueden incluir, pero sin limitación, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio proteico. Las moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, fármacos, agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), toxinas o fragmentos activos de dichas toxinas.

Como se ha descrito anteriormente, las variantes de anticuerpos pueden unirse específicamente a un antígeno diana o a un grupo de antígenos diana. Por "antígeno diana" como se utiliza en el presente documento se entiende la molécula que está unida específicamente a la región variable de un anticuerpo o inmunoglobulina determinados. Un antígeno diana puede ser una proteína, un carbohidrato, un lípido u otro compuesto químico.

La elección del antígeno adecuado depende de la aplicación deseada. Prácticamente, cualquier antígeno puede ser la diana, por ejemplo, proteínas de membrana que comprenden, pero sin limitación, el antígeno RhD, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD32B, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD71 (receptor de transferrina), CD80, CD86, CTLA-4, CD147, CD160, CD224, receptores de factores de crecimiento como los que pertenecen a la familia de receptores ErbB ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 (EGFR, HER2/neu, HER3, HER4), VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-R1,

PIGF-R, moléculas de MHC de clase I y MHC de clase II, por ejemplo, HLA-DR, receptores de interleucina como IL-1R, IL-2R alfa, IL-2R beta e IL-2R gamma, IL-6R, receptores de hormonas como el receptor de la sustancia inhibidora de Müller tipo II, el receptor de LDL, NKp44L, receptores de quimiocinas como CXCR4 y CCR5, integrinas, moléculas de adhesión como CD2, ICAM, EpCAM. Las proteínas de membrana también incluyen marcadores tumorales como GD2, GD3, CA125, MUC-1, MUC-16, antígeno carcinoembrionario (CEA), Tn, glicoproteína 72, PSMA, HMW-MAA. Los anticuerpos también pueden dirigirse a proteínas solubles, incluyendo, pero sin limitación, citocinas (por ejemplo, IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, IL-23, TGF beta, TNF alfa, IFN gamma), quimiocinas, factores de crecimiento como VEGF-A, EGF, PIGF, PDGF, IGF, hormonas, toxinas bacterianas y toxinas de otro origen como la toxina botulínica, ricina, antígeno protector de B. anthracis, factor letal de B. anthracis, factor de edema de B. anthracis, shigatoxinas 1 y 2, antígenos virales de diferentes virus, por ejemplo, virus patógenos, un anticuerpo inhibidor, incluido un anticuerpo inhibidor de FVIII.

En una realización preferida, la variante puede tener como diana CD20. En este caso, el polipéptido original puede seleccionarse entre: EMAB6 o EMAB603 (véase WO2006064121), RITUXIMAB (Rituxan ®, IDEC/Genentech/Roche) (véase por ejemplo Patente de EE.UU. No. 5.736.137), HUMAX ®-CD20, descrito en la Patente de EE.UU. No. 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulado "Variantes de inmunoglobulina y usos de las mismas").

En otra realización, la variante puede dirigirse al antígeno RhD. En este caso, el polipéptido original puede seleccionarse de EMAB2 (véase FR 03 12 229), Sym001 (Symphogen A/S) o MonoRho (ZLB, Zúrich).

El polipéptido original también puede ser Avastin ® (anti-VEGF), Remicade ® (anti-TNF-α), Erbitux ®, Vectibix ® (anti-EGFR), Tysabri ® (anti-cadena alfa 4 de integrina), Herceptin ® (anti-HER2/neu), sin que la lista sea limitativa.

La presente solicitud también proporciona variantes que muestran una mayor unión a FcRn combinada con otra propiedad optimizada seleccionada de una variedad de propiedades terapéuticamente relevantes bien conocidas. La propiedad más preferida que puede optimizarse es la semivida in vivo. Para mostrar una semivida in vivo aumentada, la variante debe exhibir una mayor afinidad de unión a FcRn a un pH más bajo, como el pH asociado con los endosomas, por ejemplo, pH 6,0, mientras mantiene la afinidad reducida a un pH más alto, como 7,4, para permitir una mayor unión a FcRn en los endosomas, pero tasas de liberación normales (Dall'Acqua et al., 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180; Gurbaxani et al., 2006, Mol Immunol. 43(9):1462-73). De manera similar, estas variantes con dicha unión modulada a FcRn pueden tener opcionalmente otras propiedades deseables, como la unión modulada a FcyR. En una realización adicional, las variantes están optimizadas para poseer una afinidad mejorada por un FcyR activador humano, preferiblemente FcyRIIIa, además del perfil de unión a FcRn. En una realización alternativa, las variantes están optimizadas para tener una afinidad aumentada por FcRn y una afinidad aumentada o disminuida por un FcyR humano, incluyendo, pero sin limitación, FcyRI, FcyRIIa, FcyRIIb, FcyRIIc y FcyRIIIb, incluyendo sus variaciones alélicas. En realizaciones alternativas, las variantes pueden tener opcionalmente funciones efectoras aumentadas (o disminuidas), así como una semivida sérica aumentada. En realizaciones particularmente preferidas, una variante puede tener una actividad ADCC aumentada y/o una mayor unión a un FcyR, así como una semivida sérica aumentada en comparación con su polipéptido original. En otras realizaciones, la variante puede tener además una actividad de CDC aumentada en comparación con su polipéptido original.

Las variantes pueden utilizarse en una amplia gama de productos. En una realización, la variante es un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación, preferentemente un reactivo terapéutico.

Dado que muestran una mayor unión a FcRn, se prevé que las variantes tengan semividas in vivo más prolongadas, más precisamente semividas en suero in vivo más prolongadas que sus polipéptidos originales. Como consecuencia, dichas variantes tienen aplicaciones útiles como sustitutos del polipéptido original cuando el polipéptido original se elimina demasiado rápido de la circulación sanguínea o para su uso en el tratamiento de enfermedades crónicas o de larga duración que requieren principios activos de semivida prolongada.

Cuando las variantes se seleccionan del grupo de anticuerpos, pueden ser útiles en una composición de anticuerpos que sea monoclonal o policlonal. En una realización preferida, dichas variantes de anticuerpos se utilizan para matar células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una realización alternativa, las variantes se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo para antagonizar una citocina o un receptor de citocina, para neutralizar un agente infeccioso como una bacteria o un virus o una toxina, por ejemplo, una toxina bacteriana. En una realización alternativamente preferida, las variantes se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y matar las células diana que portan el antígeno diana.

En una realización preferida, se administra un anticuerpo variante a un paciente para tratar un trastorno relacionado con anticuerpos. Un "paciente" incluye seres humanos y otros animales, preferiblemente mamíferos y, más preferiblemente, seres humanos. En el presente documento, por "trastorno relacionado con anticuerpos" o "trastorno sensible a anticuerpos" o "afección" o "enfermedad" se hace referencia a un trastorno que puede mejorarse mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una variante.

Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes, enfermedades

inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, dolor, enfermedades pulmonares, afecciones hematológicas, afecciones fibróticas y enfermedades oncológicas y neoplásicas, incluido el cáncer. En el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluido el liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwanoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia y neoplasias malignas linfoides. Otras afecciones que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Sjorgren, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, asma, alergias y afecciones alergénicas, enfermedad de injerto contra huésped y similares.

Otro objetivo es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden dicha variante. Dichas formulaciones se preparan mezclando la variante de polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con un portador, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.ª edición, Osol, A. Ed., 1980).

Dichas composiciones farmacéuticas están destinadas a tratar a un paciente que lo necesita.

Para tratar a un paciente que lo necesite, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la variante. Por "dosis terapéuticamente eficaz" en el presente documento se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y será determinable por un experto en la materia utilizando técnicas conocidas. Las dosis pueden variar de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,1, 1,0, 10 o 50 mg/kg de peso corporal, siendo preferidas de 1 a 10 mg/kg. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de proteínas, administración sistémica frente a localizada y velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción con fármacos y la gravedad de la afección, y serán determinables con experimentación de rutina por parte de los expertos en la materia.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante se puede realizar de diversas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, parenteral, intranasal, intraoral, intraocular, rectal, vaginal, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar.

Los agentes terapéuticos descritos en este documento pueden administrarse con otros agentes terapéuticos de manera concomitante, es decir, los agentes terapéuticos descritos en este documento pueden coadministrarse con otras terapias o agentes terapéuticos, incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas, otros productos biológicos, radioterapia, cirugía, etc.

Otro objetivo es proporcionar ácidos nucleicos aislados que codifiquen variantes.

La mayoría de las veces, el ADN que codifica el polipéptido original está disponible o se puede obtener. En consecuencia, el ADN que codifica la variante de interés se puede generar alterando el ADN que codifica el polipéptido original gracias a una variedad de procedimientos conocidos en la técnica anterior. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, mutagénesis por PCR y mutagénesis por casete. Las sustituciones de aminoácidos se realizan preferiblemente mediante mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Zoller y Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488).

Como alternativa o adicionalmente, la secuencia de aminoácidos deseada que codifica una variante de polipéptido se puede determinar y, por lo tanto, se puede generar sintéticamente mediante procedimientos bien conocidos de la técnica anterior.

Una vez que se obtienen sus ácidos nucleicos codificantes, las variantes se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización, las secuencias variantes (por ejemplo, secuencias variantes de IgG) se utilizan para crear ácidos nucleicos que codifican las secuencias miembro, y que a continuación se pueden clonar en células huésped, expresar y ensayar, si se desea. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos, y se describen en la presente una variedad de procedimientos que pueden resultar útiles en Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3.ª edición (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001)), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons)).

Los ácidos nucleicos que codifican las variantes pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar la proteína. Los vectores de expresión incluyen típicamente una proteína operativamente unida, es decir, colocada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier compañero de fusión y/o elementos adicionales. La variante (por ejemplo, variantes de IgG) puede producirse cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica la variante, bajo las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Puede utilizarse una amplia variedad de líneas celulares huésped apropiadas, incluyendo, pero sin limitación, células de mamíferos, bacterias, células de insectos y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares de mamíferos que pueden

usarse se describen en el catálogo de líneas celulares de la ATCC, disponible en la American Type Culture Collection. Las células huésped pueden ser, pero no limitadas a, YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.GII.IGAg.20, depositada en la American Type Culture Collection, ATCC n°CRL-1662), SP2/0, YE2/0, 1R983F, Namalwa, PERC6, líneas celulares CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-Lecl0, CHO-Lecl, CHO-Lecl3, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, KGH6, NSO, SP2/0-Ag 14, P3X63Ag8.653, C127, JC, LA7, ZR-45-30, hTERT, NM2C5, UACC-812 y similares. Los procedimientos de introducción de ácido nucleico exógeno en células huésped son bien conocidos en la técnica y variarán según la célula huésped utilizada. La variante se expresa en la célula YB2/0 y es un anticuerpo anti-CD20 o un anticuerpo anti-RhD.

Además, una variante puede ser producida por un animal no humano transgénico o una planta transgénica. Asimismo, un animal no humano transgénico puede obtenerse inyectando directamente un gen deseado en un óvulo fertilizado (Gordon et al., 1980 Proc Natl Acad Sci U.S. A.;77:7380-4). Los animales no humanos transgénicos incluyen ratones, conejos, ratas, cabras, vacas, vacas o aves de corral, y similares. Un animal no humano transgénico que tenga un gen deseado se puede obtener introduciendo el gen deseado en una célula madre embrionaria y preparando el animal mediante un procedimiento de quimera de agregación o un procedimiento de quimera de inyección (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)); Gene Targeting A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993))). Los ejemplos de células madre embrionarias incluyen células madre embrionarias de ratón (Evans y Kaufman, 1981, Nature; 292:154-156), rata, cabra, conejo, mono, ave, ganado vacuno y similares. Además, también se puede preparar un animal no humano transgénico utilizando una técnica clonal en la que un núcleo en el que se introduce un gen deseado se trasplanta a un óvulo enucleado (Ryan et al., 1997 Science; 278: 873 - 876; Cibelli et al., 1998 Science, 280: 1256-1258). La variante polipeptídica se puede producir introduciendo ADN que codifica la molécula variante en un animal preparado mediante el procedimiento anterior para formar y acumular de ese modo la molécula variante en el animal, y a continuación recolectar la variante polipeptídica del animal. La variante polipeptídica se puede formar y acumular en la leche, el huevo o similar del animal.

Otro objetivo es proporcionar un procedimiento para identificar variantes de Fc que sean variantes optimizadas, es decir, que tengan una mayor unión para un ligando de Fc en comparación con una región de Fc de tipo salvaje correspondiente. Dicho procedimiento comprende las etapas de:
(i) generar una biblioteca de ácidos nucleicos que consiste en un conjunto de ácidos nucleicos que codifican variantes de Fc
(ii) producir las variantes de Fc mediante la expresión de los ácidos nucleicos comprendidos en dicha biblioteca
(iii) seleccionar entre las variantes de Fc producidas en la etapa (ii), aquellas que sean capaces de unirse al ligando Fc
(iv) medir la propiedad de unión de las variantes de Fc seleccionadas en la etapa (iii) y la de un control de Fc para el ligando de Fc y
(v) seleccionar las variantes de Fc que muestran una mayor unión al ligando Fc en comparación con dicho control Fc

Las secuencias de ácidos nucleicos comprendidas en dicha biblioteca de ácidos nucleicos pueden ser ARN o ADN. En una realización preferida, dicha biblioteca comprende secuencias de ADN que codifican variantes de Fc.

El control Fc se selecciona del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje y variantes Fc conocidas que tienen una propiedad de unión para el ligando Fc igual o superior a la del Fc de tipo salvaje.

El ligando de Fc se puede seleccionar entre receptores FcRn y Fc.gamma, no siendo la lista limitativa.

En una realización, los ácidos nucleicos de la biblioteca que codifican variantes de Fc pueden generarse alterando la secuencia de ADN que codifica el Fc de tipo salvaje. Tal como se utiliza en el presente documento, por "alterar la secuencia de ácidos nucleicos" se entiende la introducción de mutaciones, tales como inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos determinada. Dichas mutaciones pueden realizarse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica anterior. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete.

En una realización preferida, la biblioteca se genera mediante mutagénesis aleatoria basada en el uso de una o más ADN polimerasas de baja fidelidad. Dicha mutagénesis aleatoria se describe en la Solicitud PCT WO0238756.

Por consiguiente, la biblioteca puede generarse mediante la mezcla de subbibliotecas generadas con una sola polimerasa o una combinación específica de polimerasas como se describe en la parte de material y procedimientos del ejemplo de la presente solicitud.

En otra realización, dicha biblioteca de ácidos nucleicos se genera alterando las secuencias de ADN que codifican un conjunto de variantes de Fc preoptimizadas utilizando uno de los procedimientos mencionados anteriormente. Se utiliza preferiblemente mutagénesis aleatoria. Las variantes de Fc preoptimizadas son variantes de Fc que comprenden al menos una modificación de aminoácidos y muestran una mayor unión para el ligando de Fc en comparación con el Fc de tipo salvaje. Las variantes de Fc preoptimizadas tienen preferiblemente de 1 a 4 modificaciones de aminoácidos en comparación con el Fc de tipo salvaje. Dichas variantes de Fc preoptimizadas se

pueden obtener a partir del cribado de una biblioteca generada por mutación de un Fc de tipo salvaje. También se refieren a variantes de Fc descritas en la técnica anterior (para ejemplos, véase anteriormente la primera parte de la presente solicitud dedicada a la descripción de la técnica relacionada). El conjunto de variantes de Fc preoptimizadas comprende varios polipéptidos, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 variantes preoptimizadas.

Las bibliotecas generadas a partir de variantes preoptimizadas permiten seleccionar variantes de Fc más optimizadas. Para ilustrarlo, véase la tabla 5 de la presente solicitud, que muestra la afinidad de unión de las mejores variantes de Fc seleccionadas a partir del análisis de dicha biblioteca.

La etapa (ii), es decir, la expresión de variantes de Fc, se puede realizar mediante procedimientos bien conocidos utilizando células huésped como se describió anteriormente. En una realización preferida, la biblioteca de Fc se expresa en la superficie de bacteriófagos (presentación de fagos) utilizando procedimientos estándar (véaseSmith, Ciencia, 1985, 228: 1315).

La etapa (iii) puede realizarse generando complejos de variantes de Fc-ligando de Fc y a continuación separando las variantes de Fc unidas de las variantes de Fc no unidas. Para realizar esta etapa de separación, el ligando de Fc puede inmovilizarse ventajosamente en un soporte sólido o debería poder inmovilizarse en un soporte sólido durante el proceso de la etapa (iii). Ejemplos de tales procedimientos se describen en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. La etapa (iii) comprende preferiblemente varias rondas de selección que permiten identificar los ligandos de Fc más eficaces (para ilustración, véase el Ejemplo 2).

En la etapa (iv), las propiedades de unión de las variantes de Fc para el ligando de Fc se pueden evaluar mediante procedimientos bien conocidos de la técnica anterior. Por ejemplo, un experto en la materia puede realizar un ELISA apropiado. La variante se selecciona si su señal específica es al menos 1,2 veces más fuerte que la del original de Fc. Se pueden realizar ensayos ELISA apropiados en Fc aislado o en Fc expresado en fagos como se ilustra en el ejemplo II y en el ejemplo IV de la presente solicitud.

Como alternativa o con fines de confirmación, el experto en la materia puede determinar la constante de disociación utilizando experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) como se ilustra en el ejemplo IV de la presente solicitud. Si la variante tiene una constante de disociación 3 veces menor que el original de Fc, entonces dicha variante se selecciona en la etapa (v).

La presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas se ilustra además, sin limitarse de ningún modo a, los ejemplos siguientes .

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

Identificación de variantes de Fc con mayor unión a FcRn en comparación con Fc de tipo salvaje y caracterización de la unión de dichas variantes.

I. Material y procedimientos

1.1 Expresión y purificación del FcRn humano

La expresión de FcRn humano soluble utilizando el sistema de baculovirus fue realizada por GTP Technology (Labege, Francia) como se describió previamente (Popov et al., Mol. Immunol. 33:521-530 (1996))). El ADNc de la cadena α que codifica el péptido líder y los dominios extracelulares (codones 1-290) fue marcado con una secuencia TEV y una etiqueta de polihistidina 6 x. La cadena α derivada y la cadena de microglobulina β2 fueron clonadas en pFastBacDual bajo los promotores P10 y polihedrina, respectivamente. Se preparó una versión biotinilada de FcRn (FcRn-biot) mediante acoplamiento químico con el kit de marcaje de proteínas FluoReporter ® Biotin-XX, F2610 (Molecular Probes) de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se produjo una proteína de fusión que contenía la cadena de microglobulina β2 y la cadena α fusionada a la parte amino terminal de la proteína p3 del bacteriófago y la proteína CVDE (FcRn-p3). Se obtuvieron proteínas con una pureza superior al 90 % después de las etapas de purificación con IgG-Sepharose e IMAC.

1.2. Construcción de las librerías Fc

El gen de Fc humano que codifica los residuos de aminoácidos 226-447 (índice EU como en Kabat), es decir, polipéptido Fc, derivado de una cadena pesada de IgG1 humana (SEQ n°1), (Poul MA et al., Eur. J. Inmunol. 25(7): 2005-2009 (1995) se clonó en el vector fagémido pMG58 (pMG58_Fc226, Figura 1) como fragmento *BamHI / EcoRI* utilizando protocolos PCR estándar. El vector mencionado se muestra en la Figura 1. Se generaron varias bibliotecas completamente aleatorizadas utilizando el procedimiento MUTAGEN™ (WO0238756) que utiliza ADN polimerasas humanas de baja fidelidad (mutasas) para introducir mutaciones aleatorias de forma

homogénea en toda la secuencia diana. Se utilizaron tres mutasas distintas (pol β, pol η y pol ι) en diferentes condiciones para crear patrones mutacionales complementarios. Estas polimerasas humanas se produjeron y purificaron como se describió anteriormente (Mondon et al., Biotechnol J. 2: 76-82 (2007)), Emond et al. Protein Eng. Del. Sel. 21: 267-274(2008)).

I. 2-a. Mutagénesis con el proceso mutagen™

El gen de Fc humano (gen de Fc) se replicó dos veces con mutasas utilizando el cebador 5' MG_619: 5'- *AGTACTGACTCTACCTA* GGATCC TGCCCACCGTGC-3' (SEQ ID N°5) y el cebador 3' MG_621 5'- *ACTGCTCGATGTCCGTA* CTATGCGGCCGCG AATTC- 3' (SEQ ID N°6) (los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* están subrayados y los caracteres en cursiva corresponden a las colas no específicas). Una mezcla que contenía 0,6 µg del plásmido pMG58_Fc226 como plantilla (Fc de tipo salvaje para la biblioteca Mut1 o variantes de Fc para la biblioteca Mut2), los cebadores MG_619 y MG_621 (250 nM cada uno) y el tampón de replicación adecuado (detallado a continuación) se trató durante 5 min a 95° C e inmediatamente se enfrió a 4°C para desnaturalizar las cadenas de ADN. Para pol β, el tampón de replicación fue 50 mM Tris HCl pH 8,8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM DTT y 1% (v/v) glicerol. El tampón de replicación para pol η (o pol η y pol ι) fue 25 mM Tris HCl pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM DTT y 2,5% (v/v) glicerol. Después de la etapa de desnaturalización, se realizaron replicaciones mutagénicas añadiendo 50 µM de dATP/dCTP, 100 µM de dTTP/dGTP y 1 µg de pol β o 100 µM de dNTPs y 1 µg de pol η (o pol η y pol ι, 1 µg de cada mutasa). La reacción de replicación se llevó a cabo a 37° C durante dos horas. A continuación, los productos de replicación se desalinizaron y se concentraron en columnas Microcon (Millipore).

I.2.b. Amplificación selectiva y clonación de fragmentos mutados

Los productos de replicación obtenidos previamente se amplificaron mediante una PCR selectiva con cebadores de cola. Los cebadores (MG_619 y MG_621) se diseñaron con una cola no complementaria al molde permitiendo la amplificación específica de los fragmentos de ADN sintetizados por las mutasas. Una fracción de los productos de replicación se añadió a una mezcla que contenía el tampón de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 pmol de los cebadores 5' y 3', 200 µM dNTPs y 1,25 U de ADN polimerasa Platinum Taq (InvitroGen). Los ciclos de PCR fueron los siguientes, primer ciclo: 2 min a 94° C, 10 seg a 64° C, 30 seg a 75° C, 1 min a 94°C y a continuación 30 ciclos selectivos: 20 seg a 94°C y 30 seg a 75° C.

Los productos de replicación amplificados se purificaron en geles de agarosa al 1% (p/v), se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* y se clonaron en el vector pMG58. Las mezclas de ligación se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue y posteriormente se sembraron en medio 2YT sólido (16 g/l de peptonas, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 1% (p/v) de glucosa. Después del crecimiento, se determinó el número de colonias para estimar el tamaño de las bibliotecas y 96 clones por biblioteca se sometieron aleatoriamente a PCR y secuenciación de ADN de alto rendimiento. Las células se rasparon en medio 2YT con 15% de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80°C.

Para la primera ronda de mutagénesis y cribado (MS1), se construyeron cuatro bibliotecas diferentes. Se obtuvo una primera biblioteca utilizando pol β en el gen de Fc de tipo salvaje y contenía $3,2\times10^6$ clones (llamados Mut1.1). El ADN de esta primera biblioteca se utilizó para generar la segunda y la tercera bibliotecas, utilizando respectivamente pol β ($3,8\times10^6$ clones, Mut1.2) y pol η y ι ($3,0\times10^6$ clones, Mut1.3). Esta estrategia en dos etapas de replicación acumulativa permitió aumentar la tasa de mutación. La cuarta biblioteca se generó con polimerasa η sola en el gen de Fc de tipo salvaje ($1,0\times10^6$ clones, Mut1.4). Finalmente, estas cuatro bibliotecas se mezclaron proporcionalmente para obtener la biblioteca final denominada Mut1, que representa $1,1\times10^7$ clones diferentes.

Para la segunda ronda de mutagénesis y cribado (MS2), se construyeron dos bibliotecas diferentes utilizando un grupo de ADN de 42 mutantes simples y dobles aislados durante MS1 y que tenían una unión a FcRn mejorada mediante ELISA de fagos. Se obtuvo una primera biblioteca utilizando pol β ($1,9\times10^7$ clones, Mut2.1) y una segunda biblioteca con pol η (1×10^6 clones, Mut2.2). Finalmente, estas dos bibliotecas se mezclaron proporcionalmente para obtener la biblioteca final denominada Mut2, que representa 2×10^7 clones diferentes.

I. 2. c. Control de calidad de las bibliotecas Fc mediante secuenciación

La calidad de las diferentes bibliotecas generadas previamente se evaluó mediante PCR en células para amplificar el gen Fc (con el cebador 5' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 7) y el cebador 3' 5'-TCACGTGCAAAAGCAGCGGC -3' (SEQ ID NO: 8) y secuenciación de alto rendimiento (con el cebador 5' 5'-TGATTACGCCAAGCTTTGC -3' (SEQ ID NO: 9). De este modo se determinaron las secuencias de 96 clones escogidos aleatoriamente en cada biblioteca (Mut1.1 a Mut1.4 y Mut2.1 a Mut2.2). Finalmente, también se secuenciaron 35 clones de la biblioteca agrupada Mut1 y 86 clones de la biblioteca agrupada Mut2 para controlar la calidad de la biblioteca final antes del proceso de selección.

Las modificaciones de las secuencias mutadas se analizaron utilizando el software propietario de MilleGen

Mutanalyse4Fc adaptado para la molécula Fc del software Mutanalyse 2.5 descrito anteriormente (Mondon et al., Biotechnol J. 2: 76-82 (2007))). Este análisis confirmó que las mutaciones se distribuyen aleatoriamente a lo largo de todo el gen, sin ningún "punto caliente".

Análisis Mut1: la frecuencia de mutaciones de la biblioteca Mut1 es de 6,3 mutaciones por kilobases (kb), lo que supone 4,2 mutaciones por gen (666 nt). Entre estas mutaciones, el 81,4% son sustituciones, el 16,8% son deleciones y el 1,8% adiciones, introduciendo estas dos últimas categorías desplazamientos del marco de lectura en el gen. Al considerar únicamente las secuencias en marco de lectura, la frecuencia de mutación es de 4,0 mutaciones por kb, es decir, 2,7 mutaciones por gen (1 a 6 nucleótidos mutados por gen). El análisis de mutaciones se realizó también a nivel de proteína para determinar la parte activa de la biblioteca. Finalmente, la biblioteca Mut1 contiene un 28,6% de clones que expresan el fragmento de tipo salvaje (no mutado o con mutaciones silenciosas), un 40,0% de clones que contienen una secuencia fuera de marco de lectura o con un codón de parada (no expresados) y un 31,4% de clones con una secuencia mutada (variantes Fc). Estos últimos clones representan la parte activa de la biblioteca, compuesta por $3,5\times10^6$ clones diferentes con una media de 2,3 aminoácidos mutados por molécula.

Análisis de Mut2: la frecuencia de mutaciones de la biblioteca Mut2 es de 4,5 mutaciones por kilobases (kb), lo que supone 3,0 mutaciones por gen. Entre estas mutaciones, el 96,3% son sustituciones, el 3,2% son deleciones y el 0,5% adiciones. Al considerar únicamente las secuencias en marco, la frecuencia de mutación es de 4,3 mutaciones por kb, es decir, 2,9 mutaciones por gen (1 a 7 nucleótidos mutados por gen). A nivel de proteínas, la biblioteca Mut2 contiene un 17,4% de clones que expresan el fragmento de tipo salvaje (no mutado o con mutaciones silenciosas), un 9,3% de clones que contienen una secuencia fuera de marco o con un codón de parada (no expresado) y un 73,3% de clones con una secuencia mutada (variantes Fc). Estos últimos clones representan la parte activa de la biblioteca, compuesta por $1,5\times10^7$ clones diferentes con una media de 1,9 aminoácidos mutados por molécula.

II. Expresión de presentación en fagos de las bibliotecas de Fc y selección de enlazadores mejorados a FcRn

La biblioteca de Fc se expresó en la superficie del bacteriófago M13 utilizando procedimientos estándar (Smith GP, Science 228: 1315 (1985)). Las bacterias de *E. coli* XL1-Blue que contienen la biblioteca Mut1 (vector pMG58) se cultivaron en 60 ml de 2YT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina y 1 % (p/v) de glucosa a 30 °C, 230 rpm hasta alcanzar una $DO_{600\,nm}$ = 0,6. A continuación, las células se infectaron con el fago auxiliar M13 (M13KO7, Biolabs, relación bacteria/fago = 1/3) a 37 °C durante 20 min y la producción de fago-Fc continuó durante la noche a 26 °C, 230 rpm en 2YT/Ampicilina/Glucosa con IPTG 0,5 mM y kanamicina 30 µg/ml. Al día siguiente, los fagos se precipitaron con PEG6000 utilizando protocolos estándar, se resuspendieron en 1 ml de tampón de fosfato pH=6 (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 50 mM pH=6,0, llamado P6) y se titularon infectando células XL1-Blue. Se aplicaron tres estrategias de selección utilizando diferentes condiciones (Figura 2) y se realizaron de 3 a 8 rondas de selección por estrategia (ver más abajo).

II.1. Selecciones en fase sólida (estrategias 1 y 2) (ver figura 2A):

Para las selecciones en fase sólida, se incubaron 4×10^{11} fagos en P6/5 % de leche desnatada/0,1 % de Tween 20 en 8 pocillos de inmunoplacas Maxisorp recubiertos previamente con 0,5 µg de neutravidina y 0,5 µg de FcRn biotinilado (estrategia 1) o 0,5 µg de FcRn-p3 (estrategia 2) y bloqueados con 5 % de leche desnatada en P6. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, los pocillos se lavaron 20 veces con P6/0,1 % de Tween 20 y se eluyeron mediante incubación en 100 µl de tampón de fosfato pH 7,4 (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 50 mM pH 7,4)/pocillo durante 2 horas a 37 °C. Después de la titulación, los fagos eluidos se utilizaron para reinfectar 10 ml de bacterias XL1-Blue en crecimiento exponencial y, posteriormente, se sembraron en medio 2YT sólido/ampicilina/glucosa. Al día siguiente, las células se rasparon en medio 2YT con 15 % de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80 °C hasta la siguiente ronda de selección.

11.2. Selección en fase líquida (estrategia 3) (ver figura 2B):

Para la selección en fase líquida, primero se incubaron 4×10^{11} fagos con 250 nM o 100 nM de FcRn biotinilado en 1 ml de P6/5 % de leche desnatada/0,1 % de Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación baja. A continuación, se añadieron perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal), previamente bloqueadas con 5 % de leche desnatada en P6, a los fagos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los complejos fago-perla se lavaron 15 veces con P6/0,1 % de Tween 20 utilizando un imán (concentrador de partículas magnéticas, Dynal). Los fagos se eluyeron mediante incubación en 500 µl de tampón de fosfato pH 7,4 (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las perlas se descartaron utilizando el imán y se recogieron los fagos eluidos en los sobrenadantes. Después de la titulación, los fagos eluidos se utilizaron para reinfectar 10 ml de bacterias XL1-Blue de crecimiento exponencial y, posteriormente, se sembraron en medio 2YT sólido/ampicilina/glucosa. Al día siguiente, las células se rasparon en medio 2YT con 15 % de glicerol, se congelaron y se mantuvieron a -80 °C hasta la siguiente ronda de selección.

11.3. Análisis de secuencias:

Durante los procesos de cribado (MS1 y MS2), para cada estrategia, desde la ronda 3 hasta la ronda 8, se

secuenciaron de 48 a 96 clones después de la PCR en células (como se describe en I.2-c.). El análisis de secuencia se realizó utilizando el software propietario de MilleGen AnalyseFc desarrollado internamente para analizar rápidamente las variantes de Fc seleccionadas. Las variantes de Fc se nombraron de acuerdo con la ronda de selección de la que se aislaron (para el cribado de Mut1: B3A a B6A para la estrategia 1, S3A a S6A para la estrategia 2 y L3A/B a L6A-F para la estrategia 3, para el cribado de Mut2: C3A a C8A para la estrategia 1, T3A a T8A para la estrategia 2 y M3A/B para la estrategia 3). Los números (1 a 96) se refieren a la localización en la placa de PCR para la secuenciación. Finalmente, durante todo el proceso de selección, se aislaron 227 clones mutados diferentes para Mut1 y 223 clones mutados diferentes para Mut2. Todos estos clones se caracterizaron mediante ensayos ELISA de fagos.

II.4. Mutagénesis dirigida

El análisis de secuencia de las variantes de Fc mejoradas aisladas durante MS1 mostró que un gran número de clones contenían mutaciones similares (N434Y, N434S, P230S, P230T...). Se realizó mutagénesis dirigida para eliminar estas mutaciones con el fin de revelar el efecto de las mutaciones asociadas. Estos nuevos mutantes se nombraron en base al clon original con una A o B añadida al final del nombre. Se probaron 61 nuevos mutantes. Algunos de estos mutantes se ilustran en la tabla 1. Los mutantes considerados como positivos tienen una señal específica entre 1,2 y 2,6 veces mayor que la de Fc-WT en el ensayo ELISA de fagos (véase más abajo). Después de MS2, se construyeron varios mutantes nuevos mediante mutagénesis dirigida añadiendo una o dos mutaciones en la región bisagra (P230S o P228L o P228R o P228L/P230S o P228R/P230S). Estos mutantes fueron nombrados basándose en el clon original con una letra (A a G) agregada al final del nombre. Se probaron 24 nuevos mutantes y se ilustran en la tabla 5.

II.5. Ensayos de ELISA de fagos de las variantes seleccionadas (Figura 3)

Las características de unión de las variantes aisladas durante MS1 y MS2 mostradas en el fago se determinaron utilizando una prueba ELISA a pH 6,0 con pocillos recubiertos por FcRn-p3 (Figura 3). Brevemente, las variantes de fago-Fc se produjeron como clones aislados en una placa de 96 pocillos en cultivos de 800 µl en 2YT/ampicilina/glucosa infectados con el fago auxiliar M13K07 (como se describe en el párrafo 3). Los fagos producidos durante la noche a 26 °C se recuperaron en los sobrenadantes después de 30 minutos de centrifugación a 3000 g. Estos sobrenadantes se diluyeron directamente (1/2 y 1/4) en P6/5% leche desnatada/0,1% Tween 20 y se probaron en inmunoplacas Maxisorp previamente recubiertas con 0,25 µg de FcRn-p3/pocillo y bloqueadas con 5% de leche desnatada en P6. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1 % Tween-20 y los fagos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-M13 con HRP (GE Healthcare).

Utilizando esta prueba ELISA, las 227 variantes de Fc seleccionadas durante MS1 se probaron en comparación con el Fc de tipo salvaje (Fc-WT) y un control positivo. Este control positivo (llamado variante Fc-H) es el mutante doble T250Q/M428L y se describió como que tiene una afinidad mejorada para FcRn (x28,Hinton PR et al., J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216 (2004)). Esta variante se generó mediante protocolos de PCR estándar con dos oligonucleótidos largos que comprenden los codones mutados y los sitios de restricción: cebador 5' 5'-CG GGATCC TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCAAAACCCAAGGACCAACTCATGATCTCCCGGAC -3' (SEQ ID NO:10) y cebador 3' 5'-GC GAATTC TTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTG GTTGTGCAGAGCCTCATGCAGCACGGAGCATGAGAAG -3' (SEQ ID NO:11) (los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* están subrayados y los caracteres en gris corresponden a los codones mutados). En el ensayo ELISA de fagos, la variante Fc-H tenía una señal específica en promedio 3,2 veces más fuerte que la Fc de tipo salvaje, es decir, Fc-WT (relación variante/Fc-WT) y entre las 227 variantes Fc analizadas, 73 variantes tenían una relación/Fc-WT >3,2, lo que significa que tenían una mejor unión a FcRn que la variante Fc-H (tabla 2). Las variantes positivas de MS1 y que tienen una única modificación de aminoácidos tienen una señal específica de aproximadamente 1,2 a 3,5 veces más fuerte que la Fc de tipo salvaje (véase la tabla 1).

Tabla 1: Variantes que tienen una única modificación de aminoácidos identificada durante MS1 u obtenida mediante mutagénesis directa

Nombre de variante	Mutación	Relación/Fc-Wt		Nombre de variante	Mutación	Relación/Fc-Wt
B4A_13	P228L	3,5		L3B_19	Q386R	1,2
B3A_32	P228R	3,1		B4A_12	K414R	1,1
B5A_35	P230S	2,8		B4A_29	K447E	1,1
L3A_20	V303A	2,8		L4F_02	A330T	1,1
L5D_47	P230Q	2,7		L5D_01	V305A	1,1
S3A_05	N434S	2,7		L6A_39	N389T	1,1

B4A_22A	A378V	2,6	S5A_18A	F404L	1,1
B5A_05	H433R	2,3	L5D_29A	Q342K	1,1
S3A_04	P230T	2,3	B4A_44A	K290R	1,1
B4A_08	V397M	2,2	L6C_10B	D265G	1,1
B5A_25B	N315D	2,1	L4A_39	D401G	1,0
B5A_15	M428L	2,0	B6A_34A	N390S	1,0
L3B_21A	V302A	1,9	L6C_44A	T359A	1,0
S3A_25A	V264E	1,9	B5A_04A	N384I	1,0
L3A_01	T256N	1,8	S3A_24A	E269D	1,0
S3A_08	P387S	1,8	L5D_09A	T289I	1,0
L3A_35	S440N	1,7	S3A_01	Q311R	0,9
L3B_20	E382G	1,7	S3A_42	K360R	0,9
B3A_08	C226G	1,6	L4F_14	G371D	0,9
B5A_17A	Q362E	1,6	L5B_35	N276S	0,9
B5A_43	R416G	1,6	L6A_29	S267N	0,9
L5A_01	N389K	1,5	B3A_02A	N421S	0,9
S3A_09A	S426T	1,4	S4A_17B	Q362R	0,9
S3A_21	N297D	1,4	S3A_26A	T394A	0,9
B3A_17	T307A	1,3	B5A_14A	Q347R	0,9
B5A_31A	Q342R	1,2	L6B_22	P395S	0,8
L3_A10	L309P	1,2	B5A_28A	K360N	0,8
L3_A16	A378T	1,2	L5D_41A	K322R	0,8
L3A_25	V264A	1,2	L5A_31	N361S	0,5

Tabla 2: variantes seleccionadas durante MS1

Nombre de variante	**Mutaciones**	**Relación/Fc-Wt**
S5A_41	P230T/V303A/K322R/N389T/F404L/N434S	9,0
B5A_01	P228R/N434S	8,2
S5A_26	Q311 R/K334R/Q342E/N434Y	7,9
B4A_21	C226G/Q386R/N434Y	6,9
S4A_07	T307P/N389T/N434Y	6,6
B5A_48	P230S/N434S	6,5
L6B_31	P230T/V305A/T307A/A378V/L398P/N434S	6,3
S4A_01	P230T/P387S/N434S	6,2
S3A_24	P230Q/E269D/N434S	6,1
S4A_14	N276S/A378V/N434S	5,9
S4A_12	R355Q/T393N/S426T/N434Y	5,8
S5A_47	P230T/N434S	5,8
S5A_43	P230S/V284L/A378V	5,7
B5A_16	S239A/S298G/N315D/Q347R/N434Y/S440R	5,6

B5A_23	Q362E/N434Y	5,4
S4A_24	V264E/R301C/A378V/E382G	5,4
L4A_28	M428 UN434S/Q438 R/P445S	5,2
S4A_03	A378V/N434S	5,2
S4A_29	P230Q/F241L/V264E	5,2
S5A_07	A378V/N421T/N434S	5,1
B6A_31	S375G/M428L/H433P	5,0
L5D_09	P230Q/T289I/N434S	4,8
S4A_06	K288R/T307P/N421S/N434S	4,7
B5A_17	N315D/Q362R/N434Y	4,6
S4A_02	A378V/N434Y	4,6
S4A_36	P230Q/V264A/P352S/A378V	4,5
S4A_44	P227S/N434Y	4,5
L5B_14	C226G/N434S	4,4
L6B_41	P230S/M428L	4,4
S6A_48	R355Q/K392E/T393N/S426T/N434Y	4,4
B6A_41	N434Y/Q438R/K447E	4,3
L5D_18	V397M/N434S	4,3
S3A_25	V264E/N434S	4,3
S5A_20	P230Q/F241Y/K246R/D270E	4,3
S4A_25	D265G/S408T/N434Y/S444F	4,2
S4A_42	V264A/N434Y/G446A	4,2
B5A_18	V412A/M428L/H433R/N434S/K447E	4,1
B4A_39	E382G/N434S	4,0
L4A_45	P228UN297D	4,0
L6A_11	M428L/H433R	4,0
S4A_30	V303A/N434S	4,0
B4A_01	E345Q/A378S/E380Q/N434Y	3,9
B4A_22	S383R/V397M/N434S	3,9
S4A_17	V302A/N389T/N434S	3,8
B4A_03	R292W/T307P/A330V/N434S	3,7
B5A_04	N384I/N434Y	3,7
B6A_20	K320T/N434Y/K439R/K447E	3,7
S4A_05	A378V/D401A/N434Y	3,7
S4A_11	N389T/N434Y	3,7
S6A_24	A231T/V397M/N434S	3,7
B4A_46	G371 D/N434Y	3,6
B5A_25	F243L/N315D/T411A/N434S	3,6
S3A_06	P230T/A231 T/A378V	3,6
B3A_02	N421S/N434Y	3,5

B4A_13	P228L	3,5
S3A_07	V264E/A378V/E382G	3,5
S4A_27	M252L/N434S	3,5
B3A_15	L309P/N434S	3,4
B3A_34	N434Y/S440N	3,4
B6A_34	N315D/A330V/N434S	3,4
S3A_09	S426T/N434S/K439R	3,4
S5A_46	Q386R/N434Y	3,4
B4A_44	P230S/K290R	3,3
B6A_36	F241L/V305A/D356N/N434Y	3,3
L5D_29	Q342K/N434Y	3,3
S5A_05	N434Y/S440R	3,3
S5A_19	F243L/N434Y	3,3
S5A_27	A327V/A378V/N389T/N434Y	3,3
B5A_28	K360N/N434Y	3,2
L3A_39	S375G/P395S/N434S	3,2
L4A_15	P395S/N434H	3,2
L4F_16	N434Y/K447N	3,2
S5A_40	T299M/N434Y	3,2

Las 223 variantes seleccionadas durante MS2 se probaron utilizando el mismo protocolo ELISA pero en comparación con la variante Fc-H y la mejor variante de Fc aislada durante MS1 (S5A_41), porque la diferencia entre la señal Fc-WT y la señal de las variantes de Fc era demasiado grande para ser comparada en la misma placa ELISA. Entre las 223 variantes de Fc probadas, 209 variantes de Fc fueron mejores que la Fc-H (relación/Fc-H > 1,1) y 39 variantes de Fc fueron mejores que la mejor variante de Fc aislada durante MS1. Para comparar las variantes con la Fc-WT, se calculó una relación/Fc-WT estimada multiplicando la relación/Fc-H de las variantes por la relación/Fc-WT de la Fc-H (= 3,2) determinada durante MS1 (relación/Fc-WT = 3,2xrelación/Fc-H) (tabla 3).

Tabla 3: variante de MS2

Nombre de variante	**Mutaciones**	**Relación/Fc-H**	**Relación/FWT**
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	8,9	28,4
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	8,7	27,8
T5A_74	N315D/A330V/N361 D/A378V/N434Y	8,6	27,6
C6A_74	V2591/N315D/N434Y	8,5	27,2
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	8,4	26,8
T5A_58	F241L/V264E/T307P/A378V/H433R	8,1	26,1
C6A_72	T250A/N389K/N434Y	8,0	25,7
T5A_93	V305A/N315D/A330V/P395A/N434Y	8,0	25,7
T5A_78	V264E/Q386R/P396L/N434S/K439R	8,0	25,6
T5A_87	N315D/A330V/Q362R/N434Y	7,8	25,0
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	7,7	24,6
C6A_85	V305A/N315D/A330V/N389K/N434Y	7,4	23,8
C8A_15	N315D/A327V/A330V/V397M/N434Y	7,4	23,7

T5A_89	P230T/F241L/V264E/D265G/A378V/N421T	7,1	22,8
T7A_92	V264E/P396L/S415N/N434S	6,7	21,4
T6A_57	P227L/V264E/A378V/N434S	6,4fhr 6,4	20,3
T5A_94	V264E/A378T/P396L	5,8	18,5
T6A_75	P230T/N315D/Q362R/S426T/N434Y	5,7	18,3
C3A_13	C226G/N315D/A330V/N434Y	5,6	17,9
T5A_55	P230L/F241L/F243L/V264E/T307P/A378V	5,6	17,9
T6A_85	T250A/N315D/N325S/A330V/N434Y	5,1	16,3
C5A_39	K290E/N315D/Q342R/E382V/N434Y	5,0	15,9
T5A_57	F241L/N315D/A330V/K392R/N434Y	4,9	15,8
C5A_09	F241 L/V264E/T307P/A378V/N434S	4,8	15,2
T6A_22	P230T/V264E/S403T/N434S	4,7	15,2
T5A_81	V264E/A378V/R416K	4,6	14,9
C6A_12	P230T/N315D/Q362E/N434Y	4,6	14,9
C4A_14	C226G/N315D/N434Y	4,6	14,8
T4A_42	C226G/N315D/Q362R/N434Y	4,6	14,7
T5A_25	C226G/V264E/Q347R/K370R/A378V/N434S	4,6	14,7
T4A_48	V308I/N315D/A330V/E382V/N434Y	4,5	14,5
C6A_48	P230T/V264E/A378V/N434S	4,5	14,4
T5A_45	A231T/F241L/V264E/A378T/V397M/N434S	4,5	14,3
T6A_23	P230L/V264E/A378V/N434S	4,4	14,1
C5A_65	P230T/N315D/A330V/Q386K/N434Y	4,2	13,5
C6A_88	C226G/N315D/A330V/N389T/N434Y	4,2	13,4
C4A_13	S267R/T307P/A378V/N421T/N434Y	4,1	13,2
C3A_35	P230S/N315D/P387T/N434Y	4,0	12,9
T4A_37	P230S/V264E/P352S/A378V/N434S	4,0	12,8
C5A_18	P230T/N315D/Q362R/N434Y	3,9	12,3
T3A_22	F241L/V264E/A378V/N434S	3,8	12,2
C5A_12	N315D/Q362E/N389K/N434Y	3,8	12,1
C4A_29	T307P/N315D/N361S/Q362R/N434Y	3,8	12,0
T4A_44	C226G/V264E/A378V/F404L	3,8	12,0
C3A_42	N315D/A330V/N389K/V397M/N434Y	3,7	12,0
C7A_82	P230T/K246R/N389T/P395S/N434Y	3,7	11,9
T4A_31	P230T/F241L/V264E/T307P/A378V	3,7	11,7
T7A_48	P230T/L234R/N315D/A330V/N434Y	3,6	11,6
T7A_49	P230T/N315D/K320E/Q362R/N434Y	3,6	11,6
C7A_43	V264E/T307P/A378V/P396S/N434S	3,6	11,5
T4A_26	V264E/T307P/A378V/E382G/Q386R	3,6	11,5
T4A_19	T307P/A378V/N434S	3,6	11,4
C4A_06	P230T/N315D/A330V/N434Y	3,6	11,4

T4A_46	P230T/N389K/N434Y	3,6	11,4
T8A_24	V264E/T307P/A378V/N434S	3,5	11,1
C6A_36	T307P/N315D/E382G/Q419H/N434Y	3,4	10,9
C7A_68	V264E/N315D/A378V/N390S/G420R/N434Y	3,4	10,9
C5A_15	V303A/N315D/A330V/E382V/N434Y	3,4	10,9
T5A_40	P230T/V264E/T307P/A378V/N421T	3,4	10,8
C4A_28	V264E/A378V/N434Y	3,4	10,8
C4A_41	N315D/A330V/Q362E/N434Y	3,4	10,8
T6A_42	C226G/N434Y	3,4	10,7
T4A_33	P230T/V264E/A378V/N389T/D399N/H433R	3,3	10,7
T5A_24	V264E/A378V/N434S	3,3	10,7
T8A_87	F241L/V264E/A378V/N421T/N434S/L443R	3,3	10,7
T6A_39	C226Y/A378V/N421T/N434S	3,3	10,4
C3A_45	F243L/N315D/A330V/N389K/N434Y	3,3	10,4
C3A_09	S298G/N434Y	3,2	10,4
T6A_21	N315D/A378V/N434Y	3,1	10,0
C6A_13	T307P/A378V/N434Y	3,1	10,0
C3A_27	N315D/S354P/S383N/N434Y	3,1	10,0
T6A_16	P230T/V264E/N315D/K370R/A378V	3,1	9,9
C3A_21	N315D/A330V/S400P/N434Y	3,0	9,8
C3A_08	V264E/P352S/A378V/N434S	3,0	9,7
T4A_18	N315D/Q342R/E382V/N434Y	3,0	9,7
T4A_04	N315D/A330V/E382V/N434Y	3,0	9,7
T7A_58	N315D/Q362E/N434Y	2,9	9,4
C6A_04	Q342R/E382V/N434Y	2,9	9,4
C5A_19	V264A/V305A/N315D/A330V/N434Y	2,9	9,3
T6A_13	P230T/N315D/A330V/Q362R/N434Y	2,9	9,3
T7A_87	P230S/N315D/Q362R/N434Y	2,9	9,3
C3A_24	T307P/N389T/D401G/N421T/N434Y	2,9	9,2
C4A_22	P230T/N434Y	2,9	9,1
T6A_47	P230T/K320T/N434Y	2,8	9,1
C5A_58	V264E/A378V/P396L/N434S	2,8	9,1
T6A_40	P230A/F241L7V264E/A378V/N421T	2,8	9,1
T5A_51	V264E/A378V/F404L/N434S	2,8	9,0
C4A_25	N315D/A330V/V397M/N434Y	2,8	8,9
T3A_15	V264E/A378V/T394A/F404L/N434S	2,8	8,9
C7A_18	V264E/A378V/K414R/N421T/N434Y	2,8	8,9
T7A_18	V264E/A378V/Q386R/N434S	2,8	8,9
C4A_36	N315D/K320T/N434Y	2,8	8,9
C5A_75	T307N/N315D/N434Y	2,8	8,9

C5A_28	T307P/N434Y	2,8	8,8
T5A_05	V264E/E269G/A378V/N421T/N434S	2,7	8,8
C8A_41	N315D/E382V/H433P/N434Y	2,7	8,8
C5A_44	N315D/N389K/N434Y	2,7	8,7
C5A_03	V264A/N315D/N434Y	2,7	8,7
T4A_45	V264 E/L309 P/P396 UN434S	2,7	8,7
C4A_27	V264A/T299A/A378V/E382G/N434Y	2,7	8,7
T6A_12	V264E/A378V/N421T/N434S	2,7	8,6
T7A_76	V264E/K370R/A378V/P396L/H433R	2,7	8,5
T5A_08	V264E/P291Q/A378V/N434S	2,6	8,5
M3A_21	F241L/V264E/T307P/A378V/N421T	2,6	8,4
C5A_20	N315D/S415D/N434Y	2,6	8,4
T6A_09	P230T/T307A/N315D/A327V/N434Y	2,6	8,3
C7A_27	V264E/T307N/A378V/V397M/N434Y	2,6	8,2
T7A_46	V264E/A378V/G385R/N434S	2,6	8,2
T8A_81	V264A/N315D/E382V/N434Y	2,5	8,2
T7A_57	P230T/T307A/N315D/A330V/Q418E/N434Y	2,5	8,1
C3A_43	N315D/R416G/N434Y	2,5	8,1
C4A_18	N315D/A330V/A378V/N434Y	2,5	8,1
T4A_41	F241 R/V264E/T307P/A378V	2,5	8,0
C3A_01	N315D/A330V/N434Y	2,5	8,0
T8A_41	V264E/P343S/A378V/N434S	2,5	7,9
T5A_28	F241L/V264E/A378V/N434Y	2,5	7,9
T3A_10	N315D/A330V/N389K/N434Y	2,4	7,8
T3A_01	V264E/T307P/A378V/N421T	2,4	7,8
T5A_59	Q342R/R355G/E382V/N434Y	2,4	7,8
M3B_09	V264A/N315D/A330V/N389K/N434Y	2,4	7,7
C8A_14	V305A/Q386R/N434Y	2,4	7,6
C4A_01	N315D/Q362R/N389K/N434Y	2,4	7,5
C4A_24	L309P/N315D/A330V/N434Y	2,3	7,5
C7A_13	F241L/V264E/A378V/N421T/N434Y	2,3	7,4
T4A_32	V264E/A378V/H433R	2,3	7,4
T3A_16	F241L/V264E/T307P/A378V	2,3	7,4
C7A_89	T307P/A327T/N389T/N421T/N434Y	2,3	7,4
C5A_50	D270N/N315D/N434Y	2,3	7,3
T3A_41	V264E/T307P/A378V	2,3	7,2
C4A_45	K246R/H285Y/N315D/A330V/N434Y	2,3	7,2
T7A_24	V264E/A378V/N421T/N434Y	2,3	7,2
T4A_28	P230T/A378V	2,2	7,0
T5A_37	S298G/N315D/A330V/N434Y	2,2	7,0

C3A_31	N315D/A330V/N389K/D401G/N434Y	2,2	6,9
C4A_15	E233D/N315D/N434Y	2,2	6,9
C7A_02	V264E/K370R/A378V/N434Y	2,2	6,9
C7A_37	F241L/N315D/N389K/N434Y	2,2	6,9
C7A_69	V264E/H285Y/A378V/N434Y	2,1	6,9
C7A_52	D265G/A378V/N434Y	2,1	6,8
T5A_64	P230T/V264A/N325S/V397M/N434S	2,1	6,7
C7A_23	S298N/A378V/N434Y	2,1	6,6
C7A_67	N315D/A330V/N389R/N434Y	2,1	6,6
T5A_03	V264E/P396L/N434S	2,0	6,4
C8A_08	V264A/N315D/A330V/N434Y	2,0	6,4
C3A_03	N315D/N434Y	2,0	6,4
T3A_47	T307P/A378T/V397M	2,0	6,3
C5A_63	S298N/N315D/A330V/N434Y	2,0	6,3
T7A_17	V264E/P291S/Q362R/A378V/N434Y	2,0	6,3
T4A_43	I332V/K370R/A378V/N434S	2,0	6,3
M3A_18	T307P/A378V/N421T	1,9	6,2
C6A_05	T307A/N315D/A330V/N434Y	1,9	6,2
C3A_15	V264E/T307A/A378V	1,9	6,0
T5A_29	N315D/E382V/N434Y	1,9	6,0
T5A_52	N315D/A327V/A330V/N434Y	1,9	5,9
T8A_45	S375A/A378V/N434Y	1,8	5,9
C6A_21	N315D/A330V/K360R/N389K/N434Y	1,8	5,8
T7A_05	V264E/T359A/N434Y	1,8	5,8
T8A_50	V264E/P396L/N434Y	1,8	5,8
T7A_94	S267N/P352S/A378V/P396L/N434S	1,8	5,8
C6A_35	T250A/N315D/A330V/N434Y	1,8	5,7
C7A_22	N315D/K334E/A378V/N434Y	1,8	5,7
M3A_06	F241L/V264E/A378T/V397M	1,8	5,7
T7A_13	C226Y/N315D/N434Y	1,8	5,7
T5A_90	N315D/A330V/K392R/S424L/N434Y	1,8	5,7
C3A_39	A231V/Q342E/N434Y	1,8	5,6
T3A_13	N315D/V369A/N434Y	1,8	5,6
T8A_34	T307A/N315D/T335A/N434Y	1,8	5,6
M3A_26	V264E/T307P/K340E/Q342R/A378V	1,8	5,6
C3A_23	N389K/N434Y	1,8	5,6
M3A_08	V264E/T307P/A378T/V397M	1,7	5,6
C8A_61	P230T/V264E/P396L/N434Y	1,7	5,5
M3B_04	F241L7V264E/Q342R/A378V	1,7	5,5
C4A_32	V264E/N315D/A378V	1,7	5,4

T7A_35	N315D/Q362R/N434Y/S444P	1,7	5,4
C7A_49	N315D/A330V/T394A/N434Y	1,7	5,3
C7A_28	N315D/S383N/N434Y	1,6	5,3
T6A_58	F241L/V264E/T307P/K338R/A378V/N434S	1,6	5,2
C6A_33	S426T/N434Y	1,6	5,2
C6A_93	V264M/D265N/N315D/A330V/N434Y	1,6	5,0
M3A_22	P230S/A378V/K439R	1,5	5,0
T3A_37	F241L/V264E/A378V	1,5	4,9
T7A_95	N315D/Q342R/N384T/N434Y	1,5	4,9
C3A_18	F241L/V264E/A378V/N421T	1,5	4,8
T3A_28	T307P/A378V/Q418R	1,5	4,8
T3A_06	T307P/A378V	1,5	4,8
C6A_23	V264E/N434Y	1,5	4,7
T3A_21	N315D/K317R/N434Y	1,5	4,7
T3A_34	V264E/P352S/A378V	1,4	4,6
C5A_48	T350A/N434Y	1,4	4,6
T3A_43	V264E/E345G/A378V	1,4	4,5
M3A_01	N361D/N434Y	1,4	4,4
T4A_39	V264E/A378V/P396L	1,4	4,4
C5A_41	N315D/A327T/A330V/Q362R/N434Y	1,3	4,3
M3A_34	S267N/T307N/K370R/A378V	1,3	4,3
T4A_34	V264E/A378V/Q418K	1,3	4,3
C3A_07	T307P/A330T/A378V	1,3	4,2
T3A_11	P291S/N315D/A327V/A330V/N434Y	1,3	4,0
C6A_02	T307N/N315D/A330V/N434Y	1,2	3,9
T3A_09	V264E/A378V/N421T	1,2	3,9
T5A_44	F241L/V264E/T307P/A378T/V397M	1,2	3,8
T3A_12	T256N/A378V	1,2	3,8
M3B_23	F241L/V264E/T307P	1,2	3,8
M3A_35	V264E/N315D/P396L	1,1	3,7
T3A_26	V397A/N434Y	1,1	3,6
T3A_08	V264E/A378V/F404L	1,1	3,5
T6A_93	T299K/Q311R/N315D/N434Y	1,1	3,5
M3A_12	N315D/Q362R/N421D/N434S	1,1	3,4
T3A_20	V303I/N434Y	1,1	3,4
T3A_30	V264E/A378V/V422A	1,1	3,4

En total, se aislaron 282 variantes de Fc que tienen una mejor unión a FcRn que a Fc-H durante los procesos MS1 y MS2. El análisis de las secuencias de estas 282 variantes de Fc reveló que incluyen mutaciones en toda la molécula en 115 posiciones diferentes (tabla 4).

Tabla 4: mutaciones de las variantes de MS1 y MS2

Posición	Porcentaje de variantes	Modificación
C226	3,9	G o Y
P227	0,7	S o L
P228	1,1	R o L
P230	16,3	S, T, L, A o Q
A231	1,4	T o V
E233	0,4	D
L234	0,4	R
S239	0,4	A
F241	9,2	L, Y o R
F243	1,4	L
K246	1,1	R
T250	1,1	A
M252	0,4	L
T256	0,7	N
V259	0,4	I
V264	33,0	A, E o M
D265	1,4	G o N
S267	1,1	N o R
E269	0,7	D o G
D270	0,7	N o E
N276	0,4	S
V284	0,4	L
H285	0,7	Y
K288	0,4	R
T289	0,4	I
K290	0,7	R o E
P291	1,1	S o Q
R292	0,4	W
E294	0,4	eliminación
N297	0,4	D
S298	1,8	G o N
T299	1,1	M, A o K
R301	0,4	C
V302	0,4	A
V303	1,4	A o I
V305	2,1	A
T307	16,3	P, A o N
V308	0,4	I
L309	1,1	P

Q311	0,7	R
N315	34,0	D
K317	0,4	R
K320	1,4	T o E
K322	0,4	R
N325	0,7	S
A327	2,5	V o T
A330	17,0	V o T
I332	0,4	V
K334	0,7	E o R
T335	0,4	A
K338	0,4	R
K340	0,4	E
Q342	3,6	R, E o K
P343	0,4	S
E345	0,7	Q o G
Q347	0,7	R
T350	0,4	A
P352	1,8	S
S354	0,4	P
R355	1,1	Q o G
D356	0,4	N
T359	0,4	A
K360	0,7	N o R
N361	1,1	D o S
Q362	6,7	R o E
V369	0,4	A
K370	2,1	R
G371	0,4	D
S375	1,1	A o G
A378	37,2	V, T o S
E380	0,4	Q
E382	6,0	V o G
S383	1,4	R o N
N384	0,7	I o T
G385	0,4	R
Q386	2,5	R o K
P387	0,7	S o T
N389	9,2	T, K o R
N390	0,4	S

K392	1,1	E o R
T393	0,7	N
T394	0,7	A
P395	1,4	A o S
P396	4,6	S o L
V397	5,0	A o M
L398	0,4	P
D399	0,4	N
S400	0,4	P
D401	1,1	A o G
S403	0,4	T
F404	1,8	L
S408	0,4	T
T411	0,4	A
V412	0,4	A
K414	0,4	R
S415	0,7	D o N
R416	0,7	K o G
Q418	1,1	R, K o E
Q419	0,4	H
G420	0,4	R
N421	7,8	T, S o D
V422	0,4	A
S424	0,4	L
S426	1,8	T
M428	2,1	L
H433	2,8	R o P
N434	79,1	Y, S o H
Q438	0,7	R
K439	1,4	R
S440	1,1	R o N
L443	0,4	R
S444	0,7	F o P
P445	0,4	S
G446	0,4	A
K447	1,4	E o N

Además, 16 posiciones están mutadas preferentemente y se consideran posiciones clave: C226, P230, F241, V264, T307, N315, A330, Q342, Q362, A378, E382, N389, P396, V397, N421 y N434. En particular, 4 posiciones están mutadas de forma más preferente y se consideran posiciones clave más preferidas: V264, N315, A378 y N434.Figura 4).

Las variantes Fc de MS2 que tienen mejor unión para FcRn en comparación con la mejor variante de MS1 (S5A_41),

se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: mejores variantes de MS2

Nombre de variante	Mutaciones	Relación/Fc-H	Desviación estándar	Relación/Fc-WT
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	8,9	1,7	28,4
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	8,7	1,9	27,8
T5A_74	N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	8,6	1,6	27,6
C6A_74	V259I/N315D/N434Y	8,5	1,5	27,2
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	8,4	1,8	26,8
T5A_58	F241L/V264E/T307P/A378V/H433R	8,1	1,5	26,1
C6A_72	T250A/N389K/N434Y	8,0	1,1	25,7
T5A_93	V305A/N315D/A330V/P395A/N434Y	8,0	1,6	25,7
T5A_78	V264E/Q386R/P396L/N434S/K439R	8,0	1,5	25,6
T5A_87	N315D/A330V/Q362R/N434Y	7,8	1,4	25,0
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	7,7	0,9	24,6
C6A_85	V305A/N315D/A330V/N389K/N434Y	7,4	1,5	23,8
C8A_15	N315D/A327V/A330V/V397M/N434Y	7,4	1,8	23,7
T5A_89	P230T/F241L/V264E/D265G/A378V/N421T	7,1	1,2	22,8
T7A_92	V264E/P396L/S415N/N434S	6,7	1,5	21,4
T6A_57	P227L/V264E/A378V/N434S	6,4	1,7	20,3
T5A_94	V264E/A378T/P396L	5,8	1,0	18,5
T6A_75	P230T/N315D/Q362R/S426T/N434Y	5,7	1,3	18,3
C3A_13	C226G/N315D/A330V/N434Y	5,6	0,9	17,9
T5A_55	P230L/F241L/F243L/V264E/T307P/A378V	5,6	1,2	17,9
T6A_85	T250A/N315D/N325S/A330V/N434Y	5,1	1,7	16,3
C5A_39	K290E/N315D/Q342R/E382V/N434Y	5,0	0,6	15,9
T5A_57	F241L/N315D/A330V/K392R/N434Y	4,9	1,0	15,8
C5A_09	F241L/V264E/T307P/A378V/N434S	4,8	0,2	15,2
T6A_22	P230T/V264E/S403T/N434S	4,7	0,9	15,2
T5A_81	V264E/A378V/R416K	4,6	1,0	14,9
C6A_12	P230T/N315D/Q362E/N434Y	4,6	0,6	14,9
C4A_14	C226G/N315D/N434Y	4,6	0,8	14,8
T4A_42	C226G/N315D/Q362R/N434Y	4,6	0,4	14,7
T5A_25	C226G/V264E/0347R/K370R/A378V/N434S	4,6	0,2	14,7
T4A_48	V308I/N315D/A330V/E382V/N434Y	4,5	0,7	14,5
C6A_48	P230T/V264E/A378V/N434S	4,5	0,8	14,4
T5A_45	A231T/F241L/V264E/A378T/V397M/N434S	4,5	0,6	14,3
T6A_23	P230L/V264E/A378V/N434S	4,4	0,7	14,1
C5A_65	P230T/N315D/A330V/Q386K/N434Y	4,2	0,5	13,5
C6A_88	C226G/N315D/A330V/N389T/N434Y	4,2	0,4	13,4
C4A_13	S267R/T307P/A378V/N421T/N434Y	4,1	0,3	13,2

C3A_35	P230S/N315D/P387T/N434Y	4,0	0,7	12,9
T4A_37	P230S/V264E/P352S/A378V/N434S	4,0	0,5	12,8
S5A_41	P230T/V303A/K322R/N389T/F404L/N434S	3,9	0,6	12,4
C6A_ 78D	P228R/T256N/A378V/N434Y	28,3	6,7	90,5
T5A_ 74D	P228R/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	26,0	5,8	83,1
C6A_ 74D	P228R/V2591/N315D/N434Y	18,6	4,6	59,7
T5A_ 74F	P228R/P230S/N315D/A330V/N361D/A378V/ N434Y	16,8	5,5	53,8
C6A_ 78B	P228L/T256N/A378V/N434Y	14,4	1,9	45,9
C6A_ 69G	P228R/P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/	11,9	4,2	38,2
	N389T/N434Y			
C6A_ 74C	P228L/V259I/N315D/N434Y	11,0	2,8	35,3
C6A_ 69E	P228R/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	10,0	2,8	32,0
C6A_ 78F	P228R/P230S/T256N/A378V/N434Y	9,4	1,8	30,1
C6A_ 78C	P230S/T256N/A378V/N434Y	9,2	2,4	29,4
C6A_ 78A	T256N/A378V/N434Y	8,7	1,0	27,8
C6A_ 74E	P228L/P230S/V259I/N315D/N434Y	8,6	2,7	27,5
C6A_ 60B	P228R/N315D/M428L/N434Y	8,6	3,9	27,4
C6A_ 69C	P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	8,4	1,3	26,8
C6A_ 69F	P228L/P230S/T307A/N315D/A330V/E382V/ N389T/N434Y	8,2	3,1	26,3
T5A_ 74C	P228L/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	7,5	1,3	24,0
C6A_ 60D	P228R/P230S/N315D/M428L/N434Y	7,4	1,4	23,8
C6A_ 74F	P228R/P230S/V259I/N315D/N434Y	7,3	1,9	23,2
T5A_ 74E	P228LYP230S/N315D/A330V/N361D/A378V/ N434Y	7,1	2,0	22,6
C6A_ 78E	P228L/P230S/T256N/A378V/N434Y	6,0	0,4	19,1
C6A_ 74A	P230S/V2591/N315D/N434Y	6,0	1,0	19,0
T5A_ 74B	P230S/N315D/A330V/N361D/A378V/N434Y	5,9	1,0	18,8

C6A_ 60C	P228L/P230S/N315D/M428L/N434Y	5,3	1,9	17,1
C6A_ 69D	P228L/T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/ N434Y	4,8	1,0	15,3
C6A_ 60A	P228L/N315D/M428L/N434Y	2,4	1,0	7,7

III. Expresión de las variantes de Fc *en E. coli*

La secuencia de Fc-WT así como la variante Fc-H y las variantes Fc aisladas durante MS1 y MS2 se subclonaron del vector fagémido pMG58 al vector pMG62, utilizando los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*, lo que permitió la expresión periplásmica soluble con una etiqueta de 6xHis C-terminal para la purificación y una etiqueta V5 para la detección en ensayos ELISA. La producción de polipéptidos de Fc recombinantes se realizó en la cepa *de E. coli* HB2151 (inducción con 0,5 mM de IPTG durante 16 horas a 20 °C). La purificación se realizó en Ni-NTA utilizando protocolos estándar y se obtuvieron alrededor de 200-500 µg de cada polipéptido.

IV. Caracterización de la unión a FcRn de las variantes de Fc mediante ELISA y resonancia de plasmón superficial (SPR)

IV.1. Caracterización de la unión a FcRn de las variantes S5A_41, S3A_07 y Fc-H en comparación con Fc_WT

IV.1.a. Ensayos ELISA

Las características de unión de las variantes de Fc producidas en un formato soluble se determinaron en comparación con el Fc-WT utilizando una prueba ELISA a pH 6,0 con pocillos recubiertos con FcRn-p3. Las variantes de Fc purificadas (como se describe en III) diluidas en serie en P6/5 % de leche desnatada/0,1 % de Tween-20 se probaron en inmunoplacas Maxisorp previamente recubiertas con 0,25 µg de FcRn-p3/pocillo y bloqueadas con 5 % de leche desnatada en P6. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1 % de Tween-20 y las variantes de Fc unidas se detectaron con un anticuerpo anti-V5 con HRP (invitroGen) (medición de DO450 nm) (Figura 5a). Se realizó una prueba ELISA en S5A_41, la mejor variante de MS1, y S3A_07, una variante equivalente a la variante Fc-H, y la variante Fc-H. Estas pruebas ELISA confirmaron que Fc-H, S5A_41 y S3A_07 habían mejorado la unión a FcRn en comparación con Fc-WT (Figura 5b, Figura 5c y Figura 5d). Para cada curva de unión, se utilizó la medición de la concentración de Fc al 50% de saturación de la curva (EC50) para caracterizar las propiedades de unión de las variantes de Fc en comparación con Fc-WT. Las proporciones obtenidas de este modo confirmaron que S5A_41 es un mejor enlazador que la variante Fc-H y que S3A_07 es equivalente a la variante Fc-H (Tabla 6).

IV.Ib Ensayos de SPR (resonancia de plasmón superficial)

La interacción de las variantes de Fc con FcRn inmovilizado se monitorizó en un instrumento BIAcore X100 utilizando un chip sensor CM5 (Biacore, GE Healthcare). La metodología fue similar a la descrita previamente para analizar las interacciones Fc-FcRn (Popov S. et al., Mol Immunol. 33(6):521-530 (1996)). El FcRn soluble recombinante se acopló a la celda de flujo 2 del chip sensor utilizando química de acoplamiento de amina. Las celdas de flujo se activaron durante 3 min con una mezcla 1:1 de 0,1 M de *N*-hidroxisuccinimida y 0,1 M de 3-(*N,N*-dimetilamino)propil-*N*-etilcarbodiimida a un caudal de 30 µl/min. El FcRn humano recombinante (5 µg/ml en 10 mM de acetato de sodio, pH 5,0) se inyectó sobre la celda de flujo 2 durante 8 min a 10 µl/min, lo que dio como resultado una densidad de superficie de 1200 a 1300 unidades de respuesta (UR). Las superficies se bloquearon con una inyección de 3 min de 1 M de etanolamina-HCl, pH 8,5. La celda de flujo 1 se utilizó como superficie de control sin FcRn y se preparó de manera similar a la celda de flujo de muestra. Los datos de esta celda de flujo en blanco se restaron de los datos de muestra.

Los fragmentos de Fc se diluyeron en PBS/Tween-20 (tampón de fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM, NaN_3 al 0,02 %, Tween-20 al 0,01 %), que se utiliza como tampón de ejecución en experimentos de unión en equilibrio. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C con concentraciones de fragmentos de Fc que oscilaban típicamente entre 1 y 200 nM a un caudal de 10 µl/min.

Los datos se recopilaron durante 10 minutos y se utilizó un pulso de 1 minuto de PBS, pH 8, que contenía 0,05 % de Tween-20 para regenerar las superficies.

Se generaron y analizaron sensogramas utilizando el software BIAevaluation versión 3.1. La UR de equilibrio observada para cada inyección se representó gráficamente frente a la concentración de Fc. Los valores de Kd de equilibrio se derivaron mediante el análisis de los gráficos utilizando el modelo de afinidad de estado estacionario incluido en el software BIAevaluation.

Las relaciones de Kd obtenidas de este modo confirmaron que S5A_41 es un mejor enlazador que la variante Fc-H y S3A_07 es equivalente a Fc-H (Tabla 6).

IV.1.c. Resumen de los resultados obtenidos

La tabla 6 a continuación muestra la caracterización de la unión a FcRn de las variantes S5A 41, S3A 07 y Fc-H en comparación con Fc WT mediante (i) ELISA de fagos, (ii) ELISA y (iii) SPR. En todos los casos, la variante S5A 41 mostró una capacidad significativamente mayor para unirse a FcRn que Fc WT.

Tabla 6: Caracterización de unión a FcRn de las variantes de Fc utilizando ELISA y resonancia de plasmón superficial (SPR). Para ELISA de fagos y ELISA de Fc-rec , la relación hace referencia a la señal específica de variante dividida por la señal específica de Fc-WT. Para SPR, la relación hace referencia a Fc-WT Kd dividida por la variante Kd.

	ELISA de fagos	**ELISA de Fc-rec**	**SPR**
Variantes de Fc	**Relación/Fc-Wt**	**Relación/WT**	**Relación/Fc-Wt**
Fc-Wt	1,0	1,0	1,0
Fc-H	3,2	27,1	7,6
S3A_07	3,5	25,3	5,2
S5A_41	9,0	66,3	10,7

IV.2. Caracterización de la unión a FcRn de otras variantes de MS2 en comparación con Fc_WT mediante SPR y ELISA

Se produjeron varias variantes de Fc de MS2 como se describió anteriormente en la parte III. La capacidad de cada variante para unirse a FcRn se analizó mediante (i) SPR y mediante (ii) ELISA como se describió anteriormente en la parte IV.2.b y en la parte IV.2.c, respectivamente.

Se muestran varios resultados en la Figura 7.

La Tabla 7 a continuación muestra los resultados obtenidos para cada variante de MS2 analizada mediante (i) SPR y (ii) ELISA. También se indican los resultados anteriores obtenidos mediante ELISA-fago.

Los ensayos ELISA y SPR mostraron que todas las variantes de Fc se unen mejor que el Fc de tipo salvaje para FcRn, lo que se correlacionó con los resultados obtenidos previamente mediante ensayos ELISA sobre variantes de fago-Fc.

Los valores de Kd de las variantes MS2 a pH = 6 variaron de 5,2 a 22,7 nM, lo que corresponde a un aumento de la afinidad de 1,3 a 5,8 veces en comparación con Fc-WT.

Tabla 7: Caracterización de unión a FcRn de las variantes de Fc utilizando ELISA y resonancia de plasmón superficial (SPR). Para ELISA de fagos y ELISA de Fc-rec, la relación hace referencia a la señal específica de variante dividida por la señal específica de Fc-WT. Para ELISA, la relación hace referencia a EC-50 de Fc-WT dividida por EC50 de variante. Para SPR, la relación hace referencia a Kd de Fc-WT dividida por la Kd de variante.

	ELISA de fagos	**ELISA en las variantes recombinantes de Fc**		**SPR**	
Nombre de clon	**Relación/WT**	**EC50 (nm)**	**Relación/Fc-Wt**	**Kd (nM) a pH=6**	**Relación/Fc-Wt**
Fc-Wt	1,0	461,2	1	30,2	1
Fc-H	3,2	16,6	28	10,7	2,8
C6A_60	26,8	2,6	177	5,2	5,8
C6A_74	27,2	7,3	63	5,9	5,2
C6A_78	27,8	4,7	97	5,8	5,2
C6A_69	28,4	3,7	124	7,2	4,2
T5A_74	27,6	5,5	85	7,1	4,2

C6A_66	24,6	4,9	95	9,7	3,1
C6A_72	25,7	7,8	59	12,4	2,4
T5A_78	25,6	4,7	97	12,4	2,4
S5A_41	9,0	9,0	51	13,9	2,2
T5A_94	18,5	166,0	3	13,7	2,2
T5A_58	26,1	9,8	47	15,4	2,0
T5A_81	14,9	144,8	3	22,7	1,3

La capacidad de las variantes de Fc para unirse a FcRn a diferentes pH también se evaluó mediante ensayo ELISA.

Para cada variante de Fc analizada previamente, se realizaron ensayos ELISA a una concentración que proporciona una DO450 nm que oscila entre 0,8 y 1,0 al realizar el ensayo ELISA a pH = 6. Las condiciones experimentales son las descritas previamente en la parte IV.1.a. La Tabla 8 a continuación indica la concentración de cada variante de Fc utilizada para realizar ensayos ELISA.

Tabla 8: Concentración de cada variante de Fc utilizada para mostrar las afinidades de unión distintas a FcRn a pHs diferentes.

	Concentración de Fc (nM)
Fc-Wt	200,0
Fc-H	6,2
C6A_69	1,2
T5A_74	1,2
C6A_60	1,2
S5A_41	2,0
C6A_78	2,5
C6A_74	5,0
C6A_72	5,0
T5A_78	12,5
C6A_66	20,0
T5A_58	50,0

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos ELISA obtenidos para cada variante. La $DO_{450\ nm}$ se correlaciona con la cantidad de variantes de Fc unidas a FcRn inmovilizado (detección de variantes de Fc unidas con anticuerpo anti-V5 HRP). Cuanto mayor fue la señal específica a la $DO_{450\ nm}$, mayor fue la unión de la variante de Fc a FcRn.

La Figura 7 muestra claramente que la unión de las variantes de Fc con FcRn varía según el pH. Como se esperaba, la unión de las variantes de Fc con FcRn a pH 7,4 es insignificante en comparación con la unión a pH 6,0.

Se puede concluir que las modificaciones de aminoácidos introducidas para obtener variantes de Fc pueden aumentar significativamente la unión a FcRn a pH 6,0 en comparación con la de Fc-WT, pero pueden no modificar significativamente la unión a pH 7,4, que sigue siendo muy baja.

EJEMPLO 2:

Producción de variantes de IgG basadas en variantes de Fc y caracterización biológica de dichas IgG.

I. Expresión de las variantes de IgG

1.1 Construcción de vectores

Las variantes de Fc C6A_69; C6A_78; T5A_74; C6A_74; C6A_60 y C6-A66 se prepararon en un formato de IgG con una especificidad anti-CD20 en la línea celular YB2/0. Con fines comparativos, también se produjo IgG basada en Fc de tipo salvaje (IgG-WT).

Para maximizar la productividad en la línea celular YB2/0, el ADNc de las cadenas pesada y ligera de longitud completa, así como el fragmento Fc que codifica las variantes, se neosintetizaron con optimización de codones para Rattus norvegicus. Se eliminaron las características no deseadas, tales como los sitios de empalme críptico o los sitios de restricción. Solo estaba presente un sitio de restricción (Apal) en la región de unión variable/constante.

En una primera etapa, se clonó la cadena pesada de tipo salvaje entre Nhel y Ascl en el vector de expresión CHK622-08, optimizado para la expresión en YB2/0, dando como resultado la construcción intermedia HCD20-Opti-GA. A continuación, se clonó la cadena ligera optimizada entre los sitios de restricción Spel y Xbal, dando como resultado la construcción final HKCD20-Opti-GA para la expresión del anticuerpo anti-CD20 de tipo salvaje (denominado IgG-WT en lo sucesivo).

Las variantes de Fc se prepararon reemplazando el fragmento Fc de IgG1 salvaje presente en HKCD20-Opti-GA por su versión apropiada. Este se clonó entre los sitios de restricción Apal y Ascl (Figura 8a).

La clonación de cada fragmento se realizó mediante procedimientos clásicos de digestión/ligación, previa transformación bacteriana. Las construcciones de expresión se cribaron mediante digestión enzimática más PCR y se validaron mediante secuenciación.

1.2. Producción de cultivos celulares

5.10^6 células de la línea celular YB2/0 (ATCC, CRL-1662) se electroporaron con cada vector de expresión linealizado, a continuación se diluyeron a 25.000 células/ml en medio RPMI 1640 + 5 % v/v de FCS dializado (InvitroGen) y se dispensaron a 1 mU de pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 3 días de recuperación celular, se aplicó presión de selección añadiendo genética concentrada (Invitrogen) a 0,5 g/L final y metotrexato concentrado (Sigma) a 25 mM final, 2 mU de pocillo. Después de 11 días de incubación, se agruparon las células resistentes para cada una de las 8 construcciones (que codificaban las variantes seleccionadas de IgG MS2 e IgG-WT) y se diluyeron progresivamente con medio DMEM + 5 % v/v de Ultra-low IgG FCS (InvitroGen) hasta que se pudieron incubar dos (2) botellas roller de 2 L que contenían 0,9 L de suspensión celular cada una a 2 rotaciones por minuto. Se permitió que las células crecieran y murieran (de 4 a 5 días) antes de la recolección del sobrenadante, la clarificación mediante centrifugación a baja velocidad y la reducción del volumen mediante ultrafiltración en un filtro Pellicon XL (Millipore).

II. Purificación y caracterización de variantes de IgG

Los sobrenadantes de cultivo concentrados se inyectaron en una columna HiTrap protein A FF (GE Healthcare). Los anticuerpos unidos se eluyeron con tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0 y las fracciones se neutralizaron utilizando 100 µl de Tris 1 M pH 7,5 por ml de tampón de elución. Las fracciones que contenían los anticuerpos se agruparon y se dializaron en PBS pH 6,0, y las muestras se filtraron de forma estéril (0,22 nm) y se almacenaron a 4 °C.

Las IgG purificadas se caracterizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. Los geles teñidos con azul de Coomassie indicaron que las IgG, independientemente de las mutaciones, se purificaron hasta una homogeneidad superior al 95 % y mostraron las bandas de cadena pesada y ligera características para cada IgG (Figura 8b y Figura 8c).

III. Caracterización de la unión a FcRn de las variantes de IgG

Las propiedades de unión de las variantes de IgG a FcRn se determinaron mediante tres pruebas distintas: (i) mediante ensayo ELISA, (ii) mediante SPR y (iii) mediante un ensayo de unión competitiva realizado en una línea de células Jurkat que expresaban un FcRn truncado en presencia de Rituximab marcado con fluorescencia (un IgG anti-CD20).

111.1. Pruebas ELISA

III.1.a. Material y procedimiento

Las propiedades de unión de las variantes de IgG producidas en Y2B/O se determinaron utilizando una prueba ELISA a pH 6,0 con pocillos recubiertos con FcRn-p3. Con fines comparativos, también se realizó un ensayo ELISA en IgG-WT.

Las variantes de IgG purificadas diluidas en serie en P6/5 % de leche desnatada/0,1 % de Tween-20 se analizaron en inmunoplacas Maxisorp recubiertas previamente con 0,1 µg de FcRn-p3/pocillo y bloqueadas con 5 % de leche desnatada en P6. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, los pocillos se lavaron 3 veces con P6/0,1 % de Tween-20 y las variantes de IgG unidas se detectaron con un Fab'2 de cabra anti-Fab'2 humano con HRP (Interchim).

Para cada variante de IgG, se representó gráficamente el porcentaje de FcRn unido frente al logaritmo de la concentración de la variante de IgG. Para cada curva de unión resultante, se determinó la medición de la concentración de IgG relacionada con el 50 % de saturación de la curva (EC50) y se comparó con la EC50 de WT-IgG.

III.1.b. Resultados de la prueba ELISA

Las pruebas ELISA mostraron que las variantes de IgG producidas tenían una mayor unión a FcRn en comparación con la de WT-IgG. Este hecho se ilustra claramente mediante curvas de unión (véase la figura 9) y por valores EC50.

Como se ilustra en la tabla 9 a continuación, la EC50 de las variantes de IgG es al menos 5,8 veces menor que la de la IgG de tipo salvaje. La mejor EC50 se obtiene para la variante C6A_69.

Tabla 9: La concentración a una saturación del 50% (EC50) obtenida a partir de la curva de unión de ELISA de cada una de las variantes de IgG. La relación hace referencia a la EC50 de WT dividida por la EC50 de variante.

Variantes de IgG	EC50 (ng/ml)	Relación de variante/WT
WT	11060	1,0
C6A_69	1021,6	10,8
C6A_78	1440,9	7,7
T5A_74	1191,8	9,3
C6A_74	2116,0	5,2
C6A_60	1904,0	5,8
C6A_66	1900,4	5,8

III.2. Mediciones de afinidad de unión de IgG/FcRn con SPR

III.2.a. Material y procedimiento

La interacción de IgG-WT y variantes de IgG con FcRn humano inmovilizado, recombinante se controló mediante detección por resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento BIAcore X100 (GE Healthcare). El protocolo experimental fue similar al utilizado para determinar la afinidad de las variantes de Fc (véase el párrafo IV.2.b. anterior).

La UR de equilibrio observada para cada inyección se representó gráficamente frente a la concentración de Fc. Los valores de Kd de equilibrio se derivaron mediante el análisis de los gráficos utilizando el modelo de afinidad de estado estacionario incluido en el software BIAevaluation. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el ajuste global de los datos de fase de asociación y disociación con un modelo 1:2.

III.2.b. Resultados del SPR

La afinidad de unión (valores Kd) de la IgG-WT por el FcRn humano fue de 78,3 nM. Como se ilustra en la tabla 10, los valores Kd de las 6 variantes de IgG oscilaron entre 10,5 y 18,8 nM, lo que mostró un aumento de la afinidad por el FcRn a pH 6,0 de 4 a 7 veces en comparación con la de la IgG-WT.

Tabla 10: Valores de Kd obtenidos mediante SPR. La relación hace referencia a kd de WT dividida por la kd de variante. Para determinar los parámetros cinéticos se ajustaron los conjuntos de datos para la interacción de la IgG WT y las variantes con FcRn humano con el modelo 1:2 incluido en el software de BIAevaluation. Las curvas obtenidas con la IgG WT no se ajustaron con el modelo 1:2, mientras que las curvas obtenidas con la variante de IgG C6A_66 y todas las otras variantes se ajustan bien con el modelo 1:2 (datos no se muestran).

	K_d (nM)	**Relación de WT/variante**
WT	78,27	1
C6A_69	18,77	4
C6A_78	17,64	4
T5 A_74	10,55	7
C6 A_74	12,87	6
C6 A_60	13,79	6
C6 A_66	15,18	5

Como se ilustra en la tabla 11 a continuación, la afinidad mejorada de las variantes de IgG por FcRn humano en relación con el WT se debió predominantemente a una cinética de asociación aumentada (valores de kon). Por lo tanto, la relación que se refiere a las variantes kon dividido por WT-kon varió de 13 a 23, lo que indica un aumento significativo en la afinidad de las variantes por FcRn. Los valores aumentados de Koff de las variantes de IgG en relación con WT variaron de 2 a 4, lo que muestra un impacto débil de la disociación en comparación con la asociación.

Tabla 11: Velocidades de disociación (koff) y asociación (kon) determinadas por SPR

	$k_{on}(x10^5)$	$k_{off}(1/s)$	K_D (nM)
WT	0,36	0,00355	99
C6A_69	7,60	0,00837	11
C6A_78	8,19	0,00981	12
T5A_74	5,22	0,00885	17
C6A_74	5,81	0,01349	23
C6A_60	8,12	0,00788	9,7
C6A_66	4,83	0,01264	26

III.3. Unión a FcRn de Jurkat

III.3.a. Material y procedimiento

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia competitiva para evaluar la capacidad de IgG WT y variantes para interactuar con FcRn mediante un procedimiento adaptado del descrito por Dall'Ozzo et al.Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G, Cancer Res., 1 de julio de 2004;64(13):4664-9).

Brevemente, se diluyeron IgG WT y variantes en PBS pH6 a una concentración final que oscilaba entre 0,06 y 2 mg/ml y se incubaron con FcRn de Jurkat (150000 células) en presencia de Rituximab conjugado con Alexa (Rituximab marcado) a una concentración de 50 µg/ml. Después de 20 minutos, se analizaron las células mediante citometría de flujo para cuantificar la unión Alexa-Rituximab. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la intensidad de fluorescencia media (MFI), 100% se refiere a la intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida con Rituximab conjugado con Alexa solo (es decir, sin competidor) y 0% se refiere al valor de MFI medido cuando FcRn de Jurkat no se incubó con Rituximab conjugado con Alexa. Cada experimento se realizó por triplicado.

Los controles comprenden la incubación de (i) Rituximab no marcado o (ii) IgG-WT.

Para cada IgG analizada, se representó gráficamente la MFI frente al logaritmo de la concentración de IgG. Se determinó la concentración (IC50) de cada IgG analizada que proporciona una inhibición del 50 % de la señal del MFI.

Una descripción general de este ensayo también se puede encontrar en la Solicitud de patente francesa publicada con el número FR 2 894 983.

III.3.b. Resultados experimentales

Se muestran varios resultados en la Figura 11, en la que la unión de Ritixan y de varias variantes a FcRn de Jurkat se ha determinado como se describe en la Sección de Materiales y Procedimientos anterior y se ha expresado como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI).

Como se ilustra en la tabla 12 a continuación, la IC50 obtenida para las variantes es significativamente menor que la obtenida para WT-IgG. La disminución de la IC50 para las variantes de IgG fue de 40 a 60 veces, excepto para C6A_66.

Tabla 12: La IC50 obtenida para el ensayo de competencia de unión realizado en células Jurkat que expresan FcRn en presencia de Rituximab marcado con fluorescencia. Los valores de «50% RTX=1» consisten en los valores de IC50 que también se expresan en µg/ml.

	IC50 (µg/ml)	50% RTX= 1
Rituximab	ND	≠ 1
WT	219	5

C6A_69	4	240
C6A_78	4	275
T5A_74	4	224
C6A_74	5	200
C6A_60	3	234
C6A_66	21	48

III.4. Conclusión

Las tres pruebas distintas realizadas para caracterizar las propiedades de unión de las variantes de IgG a FcRn proporcionaron resultados consistentes. En todos los casos, las variantes de IgG mostraron una unión significativamente mayor a FcRn en comparación con la del tipo salvaje de IgG.

IV. Caracterización funcional de las variantes de IgG y comparación con IgG-WT y LFB-R603

Se evaluó la capacidad de las variantes de IgG para unirse a los receptores Fcγ y sus actividades ADCC y CDC para caracterizar completamente sus funciones biológicas.

IV.1. Unión de variantes de IgG a hFcγRIIIA

IV.1.a. Ensayo ELISA: unión de la variante de IgG a hFcγRIIIA recombinante inmovilizado

El FcγRIIIA recombinante humano (alotipo F158) se biotiniló con el kit EZ-link NHS-PEO (Pierce), se diluyó a 1 µg/ml en tampón de ensayo (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,35, 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA) y recubrió placas ELISA de estreptavidina react-bind™ (Pierce) durante 2 h a temperatura ambiente. Durante este tiempo de incubación, se prepararon complejos IgG-F(ab')2 anti-F(ab')2 en tampón de ensayo mezclando 5 µg/ml de IgG y 2 µg/ml de F(ab')2 anti-F(ab')2 humano marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de complejos a las placas y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de lavar las placas con tampón de ensayo, se detectaron los complejos unidos a hFcγRIIIA con TMB (Pierce). Se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas (Tecan).

Para cada variante de IgG, se representó el porcentaje de FcγRIIIA unido (que se obtiene a partir de DO450nm) frente a la concentración de la variante de IgG.

Como se muestra en la Figura 10, la unión de las variantes de IgG a hFcγRIIIA es similar a la de la IgG WT, excepto la variante C6A_66 que no se une a hFcγRIIIA.

IV.2. Actividad del ADCC

Las células asesinas naturales (células NK) se purificaron a partir de sangre periférica de donantes sanos mediante la técnica de depleción negativa desarrollada por la empresa Miltenyi. El ensayo ADCC comprende la incubación de las células NK con las células diana de la línea Raji que expresan el receptor CD20, en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD20. Después de 16 horas de incubación, se mide cromogénicamente la citotoxicidad inducida por los anticuerpos anti-CD20 cuantificando en los sobrenadantes celulares el nivel de una enzima intracelular denominada lactato deshidrogenasa (LDH) que es liberada por las células diana lisadas. Los resultados se muestran en la Figura 12.
Los resultados de lisis específica se expresan como el porcentaje de lisis en función de la concentración de anticuerpos. La EC50 (cantidad de anticuerpo que induce el 50 % de la lisis máxima) se calculó utilizando el software PRISM. Los experimentos de control se realizaron con (i) Rituximab, (ii) WT-IgG producida en células Y2/0 y LFB-R603, que es un anticuerpo anti-CD20 conocido por tener función ADDC que ha sido descrito por de Romeuf et al. en 2004 (de Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, Fournier N, Gaucher C, Glacet A, Jorieux S, Bihoreau N, Behrens CK, Béliard R, Vieillard V, Cazin B, Bourel D, Prost JF, Teillaud JL, Merle-Béral H. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcgammaRIIIA/CD16. Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6):635-43), así como en la Solicitud PCT n° WO 2006/064121.

La Tabla 13 a continuación muestra la EC50 para cada variante y compara la función ADCC de las variantes de IgG con la de LFB-R603 y WT-IgG.

Todas las variantes de IgG muestran actividad ADCC excepto la variante C6A_66. Esta variante no tiene actividad ADCC, lo que es coherente con su muy baja afinidad por FcγRIII.

Cabe señalar que C6A_69, C6A_60 y C6A_74 tienen una actividad ADCC aumentada en comparación con IgG-WT. Las otras variantes (a saber, C6A_78 y T5A_75) tienen una actividad ADCC similar a la de IgG-WT.

Tabla 13: EC50 (cantidad de anticuerpos que induce el 50% de lisis máxima) obtenida a partir de un ensayo de ADCC. La relación hace referencia a la EC50 de variante dividida por la EC50 de LFB-R603.

	EC50 (µg/ml)	Relación de R603/variante
LFB-R603	0,2	1,0
Rituximab	>5000	ND
WT	1,2	6,0
C6A_69	0,5	2,3
C6A_78	1,0	4,7
T5A_74	0,7	3,3
C6A_74	0,2	0,9
C6A_60	0,3	1,6
C6A_66	>5000	ND

IV.3. Actividad de CDC

En esta técnica, las células diana CD20+ de la línea Raji se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD20 (0 a 5000 ng/ml) en presencia de suero de cría de conejo como fuente de complemento (Cedarlane ref.: CL3441, dilución a 1/10). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se mide cromogénicamente (Roche Applied Sciences Cytotoxicity Detection Kit) la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas y se utiliza para cuantificar la citotoxicidad dependiente del complemento mediada por los anticuerpos. Los resultados se expresan como porcentaje de lisis. La EC50 (cantidad de anticuerpo que induce el 50% de la lisis máxima) y la Emax (porcentaje de lisis máxima) se calcularon utilizando el software PRISM.

La Tabla 14 a continuación muestra los valores de Emax y EC50 obtenidos para cada variante.

El nivel de actividad de CDC varía según las variantes de IgG.

C6A_78 y C6A_60 tienen una actividad de CDC significativamente mayor que la de IgG-WT, mientras que C6A_69, T5_74 y C6A_66 muestran una actividad de CDC baja.

La actividad CDC de la variante C6A_74 es similar a la de IgG-WT.

Tabla 14: EC50 (cantidad de anticuerpos que induce el 50% de lisis máxima) obtenida a partir de un ensayo de CDC.

	Emax (% de lisis)	EC50 (ng/ml)
LFB-R603	61,87	514,0
Rituximab	65,60	419,0
WT	57,32	541,1
C6A_69	ND	>5000
C6A_78	75,99	117,3
T5A_74	ND	> 5000
LFB-R603	61,87	514,0
C6A_74	59,90	458,4
C6A_60	77,22	92,66
C6A_66	10,28	935,1

IV.3. Conclusión

Las seis variantes de IgG producidas de forma recombinante en la línea celular Y2B/0 tienen una mayor unión al receptor FcRn en comparación con la IgG-WT (producida en la misma célula huésped y en las mismas condiciones).

Las variantes de IgG tienen al menos la misma afinidad de unión a FcgRIII y dicha al menos la misma actividad ADCC que IgG-WT, excepto C6AA_66 que muestra poca afinidad por FcgRIII.

Las variantes de IgG muestran actividades CDC distintas.

Para concluir, en algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos permiten obtener variantes de IgG que tienen una mayor unión para FcRn combinada con una o más actividades efectoras de Fc que son al menos similares a las de la IgG original correspondiente (es decir, IgG-WT).

En otro aspecto, las modificaciones de aminoácidos permiten obtener variantes de IgG que tienen una mayor unión para FcRn combinada con al menos una actividad efectora de Fc disminuida tal como CDC o ADCC.

La Tabla 15 a continuación muestra las principales conclusiones sobre las variantes de IgG del presente estudio.

Tabla 15: Principales resultados obtenidos para las variantes de IgG de la invención en comparación con IgG-WT; ++: Unión aumentada a FcRn en comparación con WT-IgG ; ↑: Actividad aumentada en comparación con WT-IgG ; ↓: Actividad disminuida en comparación con WT-IgG ; √; Actividad similar a la de WT-IgG

Variante	Mutaciones	Unión a FcRn	ADCC	CDC
C6A_69	T307A/N315D/A330V/E382V/N389T/N434Y	++	↑	↓
C6A_78	T256N/A378V/S383N/N434Y	++	√	↑
T5A_74	N315D/A330V/N361 D/A378V/N434Y	++	√	↓
C6A_74	V259I/N315D/N434Y	++	↑	√
C6A_60	P230S/N315D/M428L/N434Y	++	↑	↑
C6A_66	E294del/T307P/N434Y	++	↓√	↓

Tabla 7: Secuencias incluidas en el listado de secuencias

SEQ ID NO:	**Secuencias**
1	Fc de IgG1 humana (residuos 226-447 de acuerdo con el índice de EU como Kabat)
2	Fc de IgG2 humana
3	Fc de IgG3 humana
4	Fc de IgG4 humana
5	Cebador
6	Cebador
7	Cebador
8	Cebador
9	Cebador
10	Cebador
11	Cebador
12	Fragmento de cadena pesada de IgG1, alotipo G1m1,17
13	Fragmento de cadena pesada de IgG1, alotipo G1m3
14	Fragmento de cadena pesada de IgG2
15	Fragmento de cadena pesada de IgG3

16	Fragmento de cadena pesada de IgG4

REIVINDICACIONES

1. Variante de un polipéptido original que comprende una región Fc, variante que exhibe una mayor unión a FcRn en comparación con dicho polipéptido original y comprende una combinación de modificaciones de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en 307A/315D/330V/382V/389T/434Y, 256N/378V/383N/434Y, 315D/330V/361D/378V/434Y, 259I/315D/434Y, 230S/315D/428L/434Y, 241L/264E/307P/378V/433R, 250A/389K/434Y, 305A/315D/330V/395A/434Y, 264E/386R/396L/434S/439R, 315D/330V/362R/434Y, 305A/315D/330V/389K/434Y, 315D/327V/330V/397M/434Y, 230T/241L/264E/265G/378V/421T, 264E/396L/415N/434S, 227L/264E/378V/434S, 264E/378T/396L, 230T/315D/362R/426T/434Y, 226G/315D/330V/434Y, 230L/241L/243L/264E/307P/378V, 250A/315D/325S/330V/434Y, 290E/315D/342R/382V/434Y, 241L/315D/330V/392R/434Y, 241L/264E/307P/378V/434S, 230T/264E/403T/434S, 264E/378V/416K, 230T/315D/362E/434Y, 226G/315D/434Y, 226G/315D/362R/434Y, 226G/264E/347R/370R/378V/434S, 3081/315D/330V/382V/434Y, 230T/264E/378V/434S, 231T/241L/264E/378T/397M/434S, 230L/264E/378V/434S, 230T/315D/330V/386K/434Y, 226G/315D/330V/389T/434Y, 230S/315D/387T/434Y, 230S/264E/352S/378V/434S y 230T/303A/322R/389T/404L/434S de la región Fc en comparación con dicho polipéptido original, en donde la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

2. Variante, según la reivindicación 1, en la que dicha variante es un anticuerpo.

3. Variante, según la reivindicación 2, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.

4. Composición farmacéutica que comprende una variante, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Ácido nucleico aislado que codifica una variante, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.

7. Célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 6.

8. Procedimiento para producir una variante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 de modo que se exprese el ácido nucleico.

9. Medicamento que comprende una variante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

10. Utilización de una variante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento.

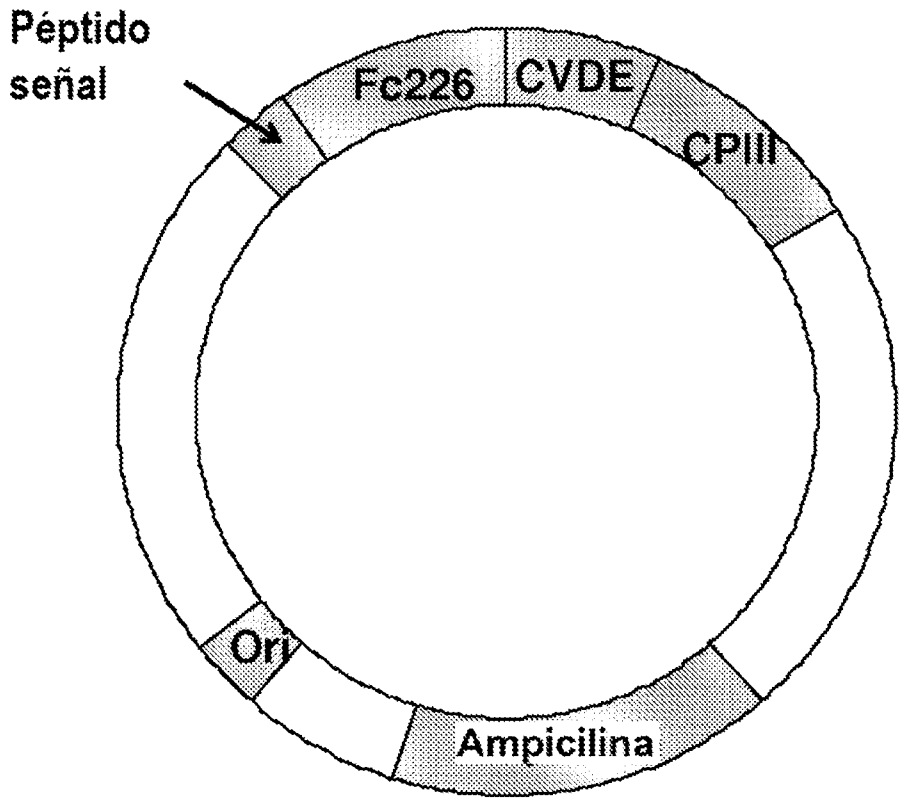


FIGURA 1

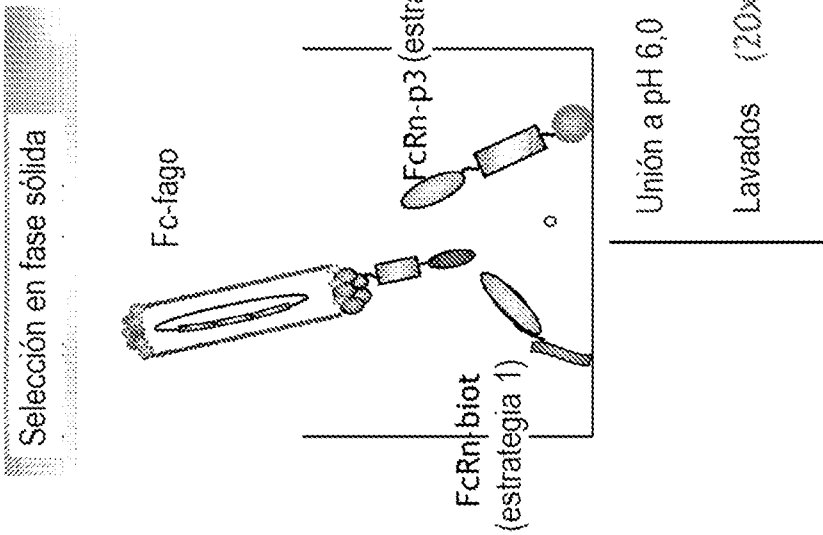


FIGURA 2A

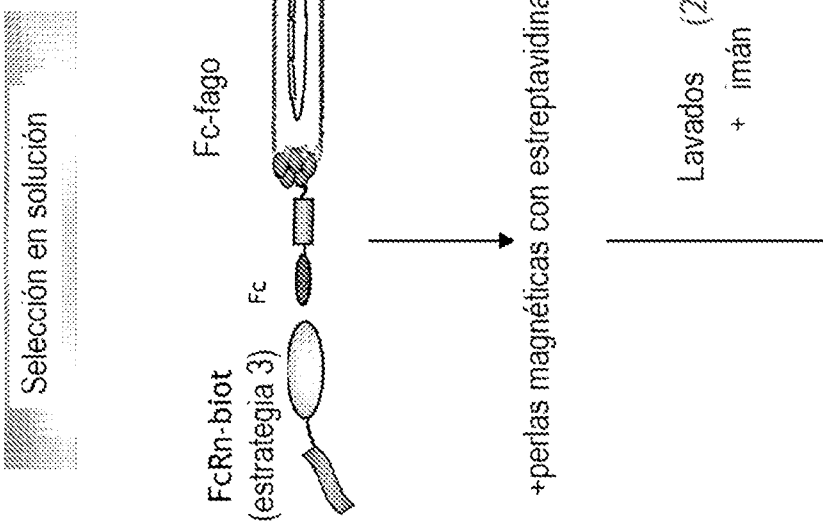


FIGURA 2B

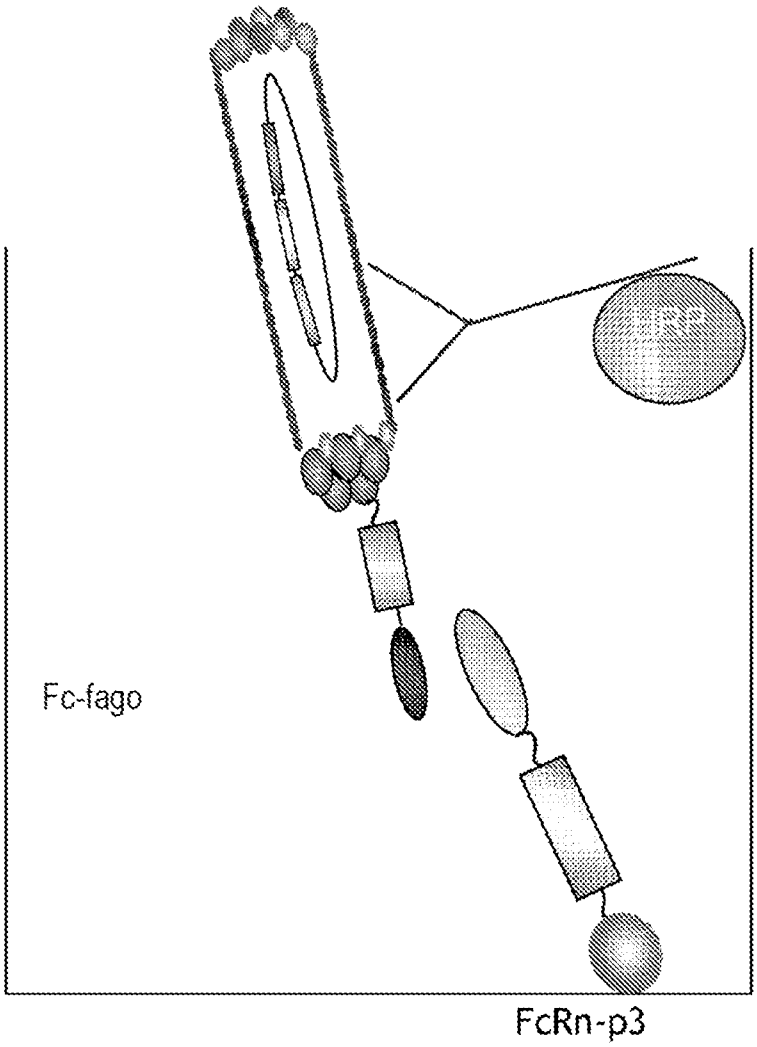


FIGURA 3

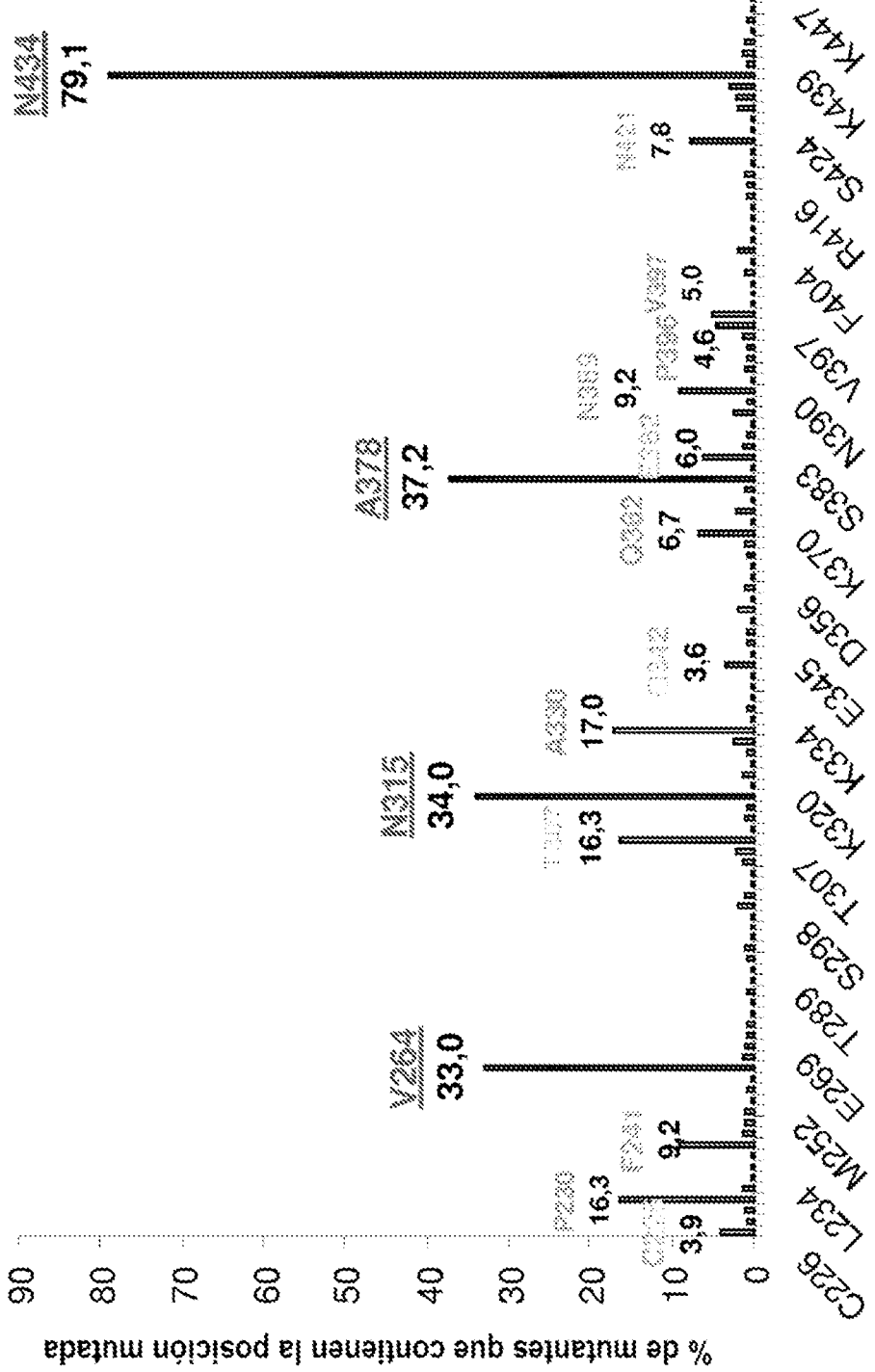

% de mutantes que contienen la posición mutada
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
3,9
16,3
9,2
33,0
16,3
34,0
17,0
3,6
6,7
37,2
6,0
9,2
4,6
5,0
7,8
79,1
C226 L234 M252 E269 T289 S298 T307 K320 K334 E345 D356 K370 S383 N390 V397 F404 R416 S424 K439 K447

FIGURA 4

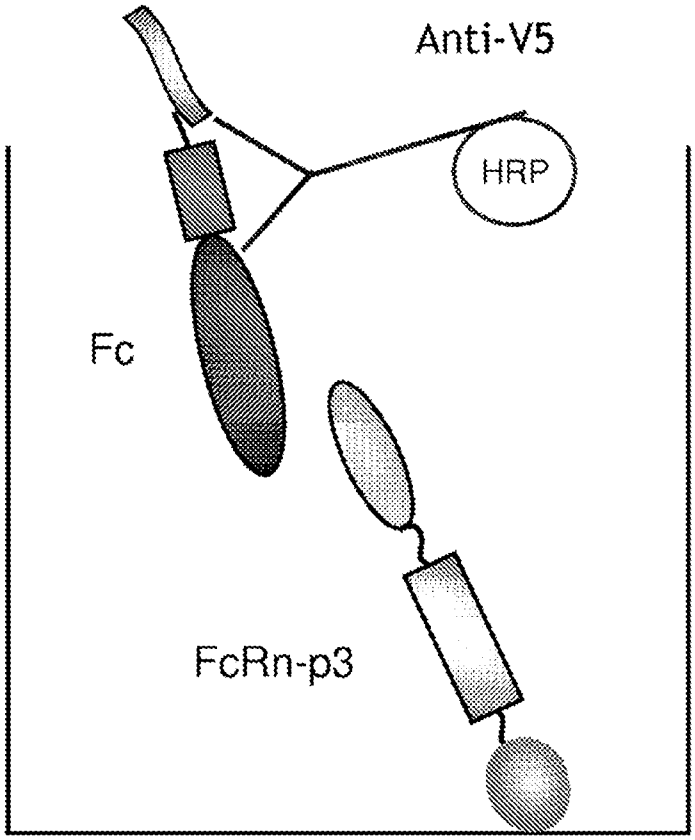


FIGURA 5A

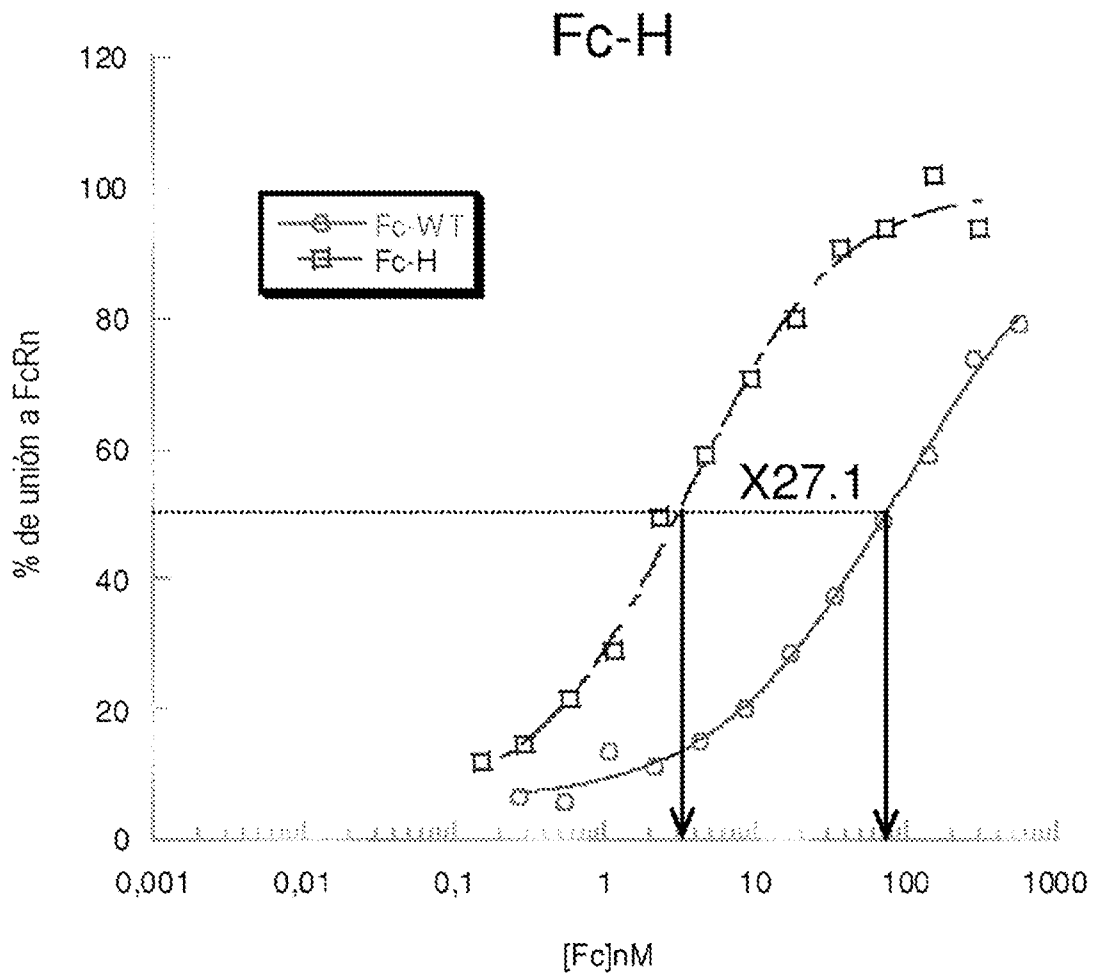

Fc-H
120
100
80
60
40
20
0
% de unión a FcRn
Fc-WT
Fc-H
X27.1
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Fc]nM

FIGURA 5B

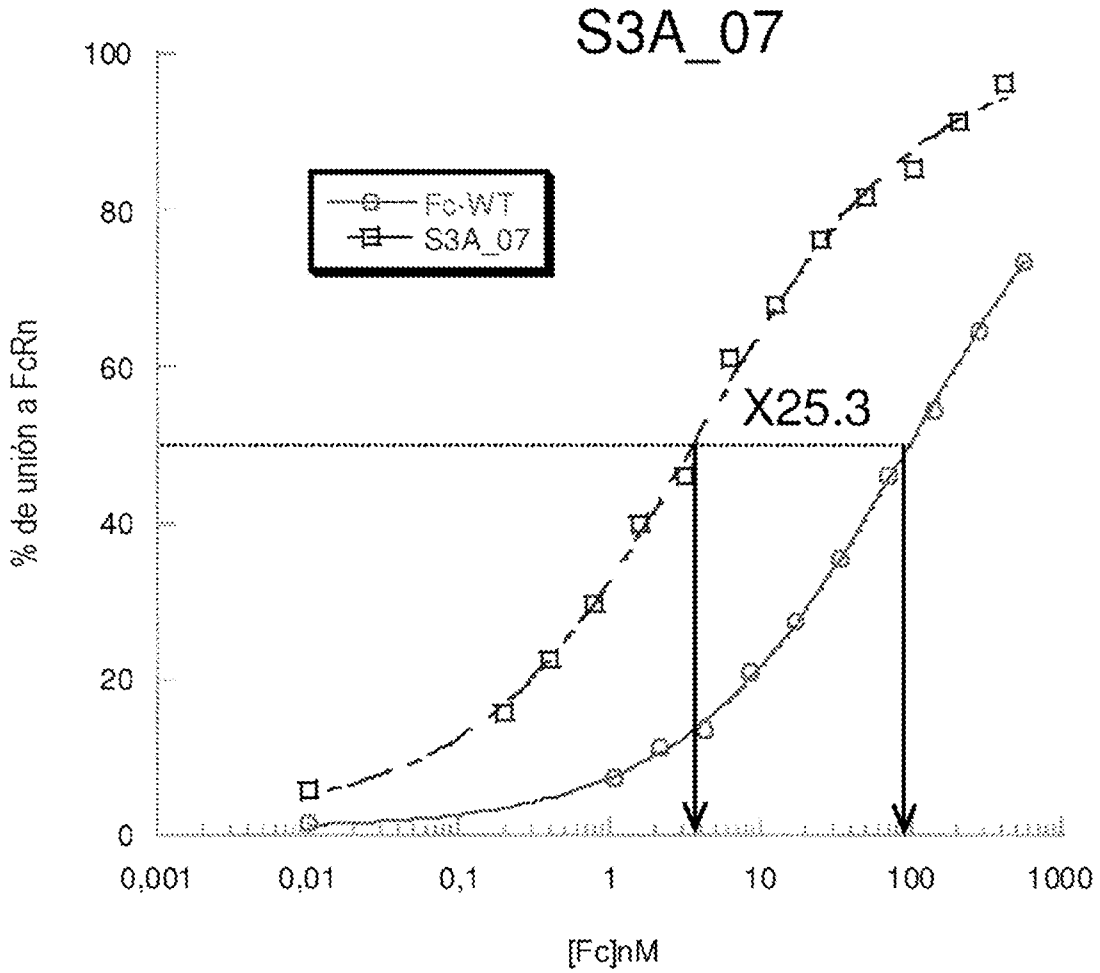

S3A_07
Fc-WT
S3A_07
X25.3
% de unión a FcRn
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Fc]nM

FIGURA 5C

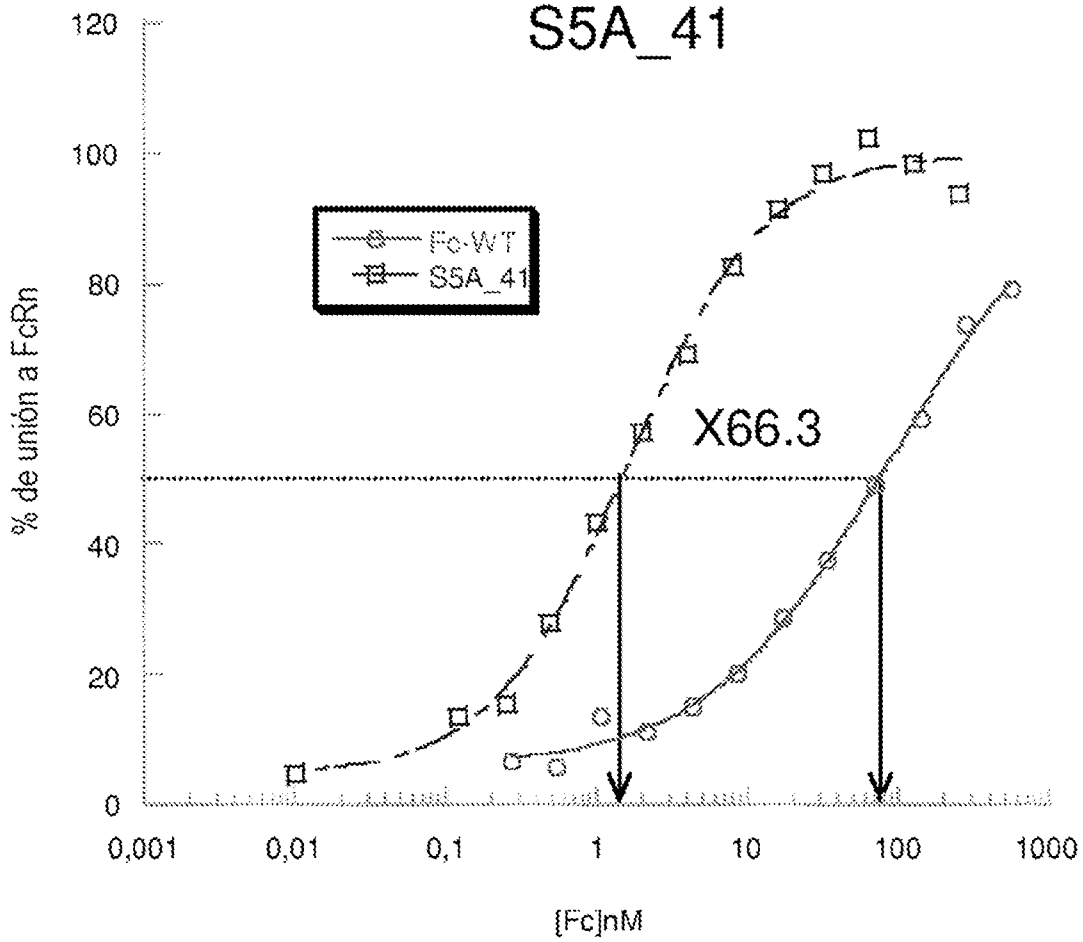

S5A_41
120
100
80
60
40
20
0
% de unión a FcRn
Fc-WT
S5A_41
X66.3
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[Fc]nM

FIGURA 5D

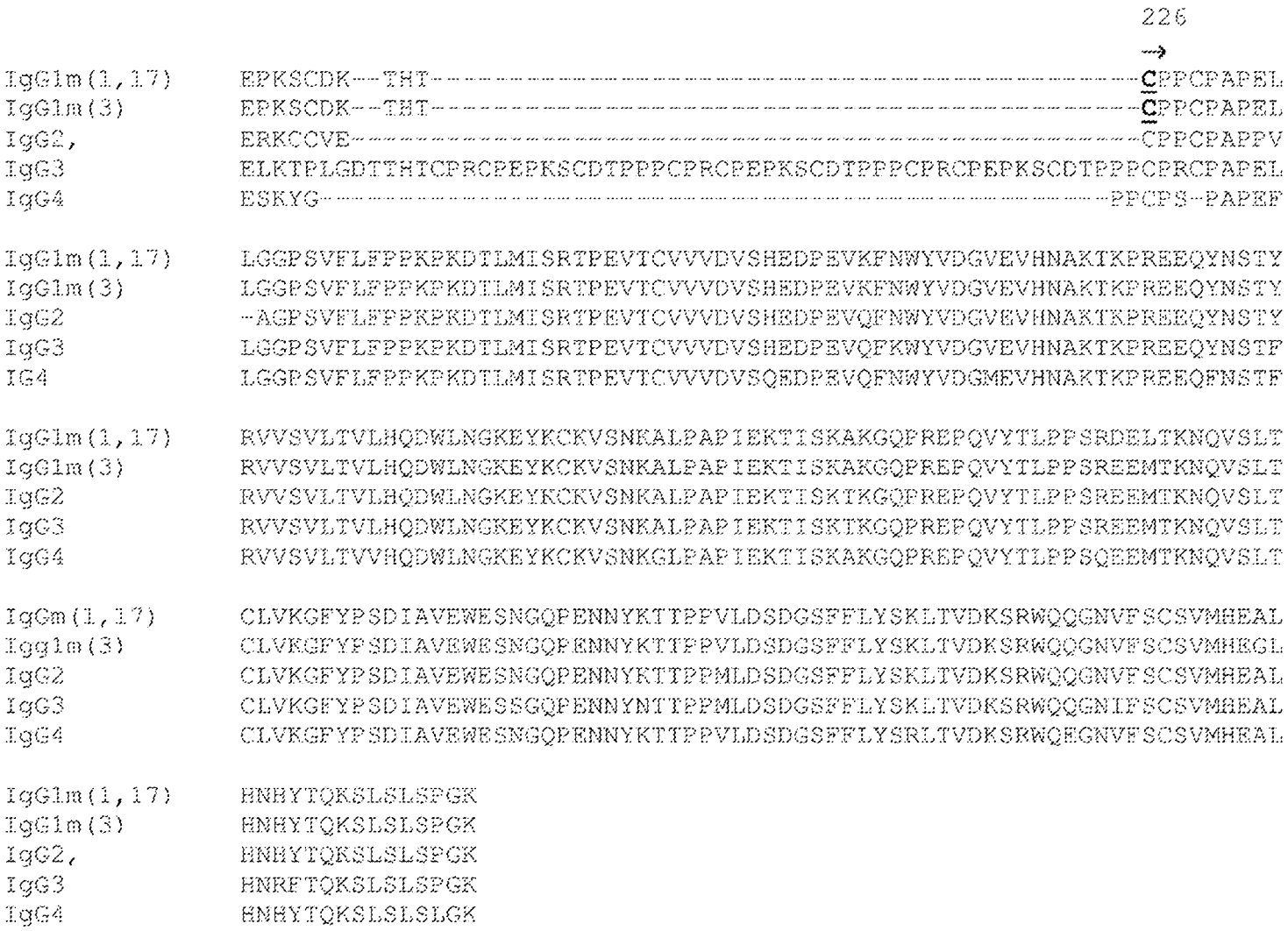

226
IgG1m(1,17) EPKSCDK--THT----------CPPCPAPEL
IgG1m(3) EPKSCDK--THT----------CPPCPAPEL
IgG2, ERKCCVE----------CPPCPAPPV
IgG3 ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEL
IgG4 ESKYG----------PPCPS-PAPEF
IgG1m(1,17) LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG1m(3) LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG2 -AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
IgG3 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTF
IG4 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTF
IgG1m(1,17) RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
IgG1m(3) RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG2 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG3 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG4 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
IgGm(1,17) CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
Igg1m(3) CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGL
IgG2 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
IgG3 CLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEAL
IgG4 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
IgG1m(1,17) HNHYTQKSLSLSPGK
IgG1m(3) HNHYTQKSLSLSPGK
IgG2, HNHYTQKSLSLSPGK
IgG3 HNRFTQKSLSLSPGK
IgG4 HNHYTQKSLSLSLGK

FIGURA 6

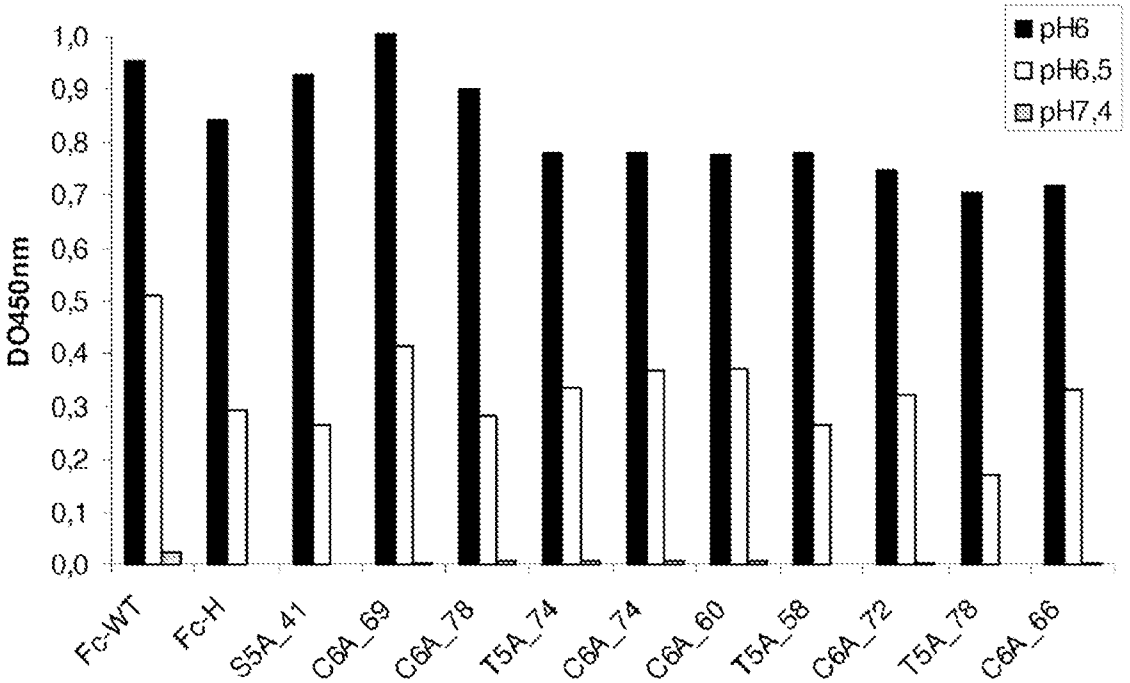

pH6
pH6,5
pH7,4
DO450nm
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Fc-WT
Fc-H
S5A_41
C6A_69
C6A_78
T5A_74
C6A_74
C6A_60
T5A_58
C6A_72
T5A_78
C6A_66

FIGURA 7

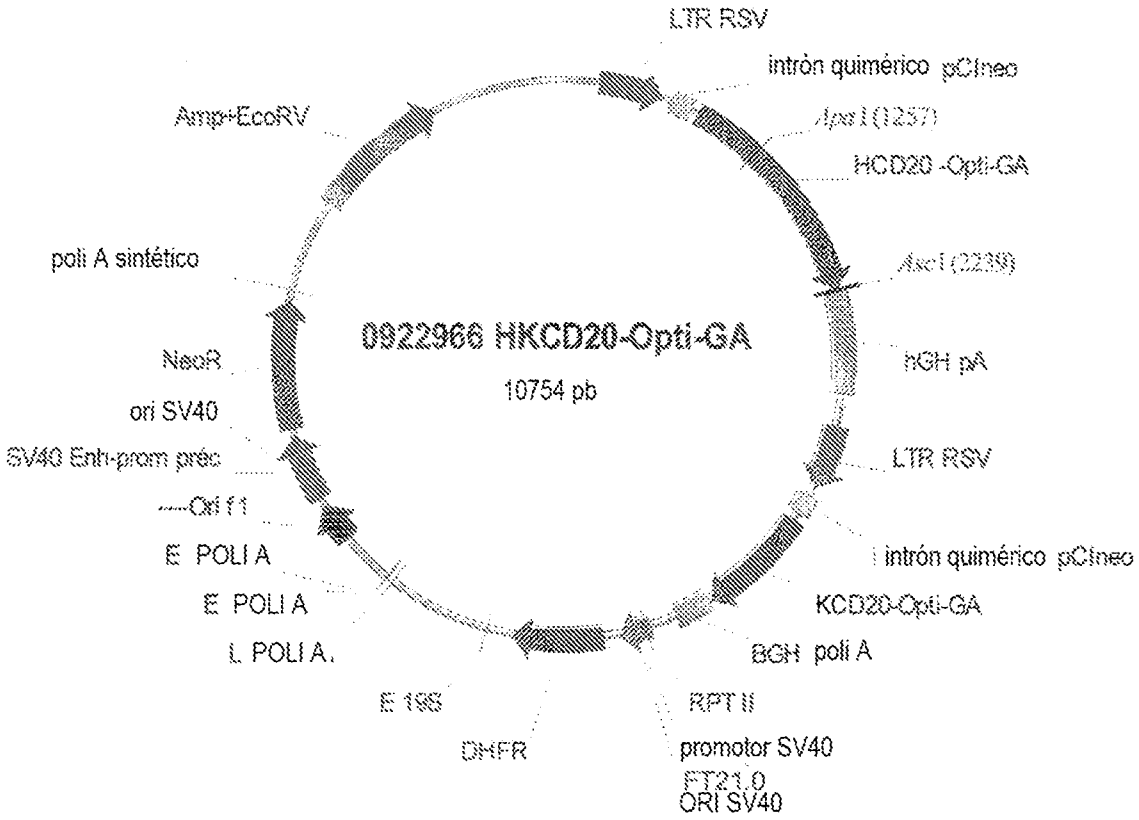

LTR RSV
intrón quimérico pCIneo
HCD20 -Opti-GA
hGH pA
LTR RSV
intrón quimérico pCIneo
KCD20-Opti-GA
BGH poli A
RPT II
promotor SV40
ORI SV40
DHFR
E 16S
L POLI A.
E POLI A
E POLI A
Ori f1
SV40 Enh-prom préc
ori SV40
NeoR
poli A sintético
Amp+EcoRV
0922966 HKCD20-Opti-GA
10754 pb

FIGURA 8a

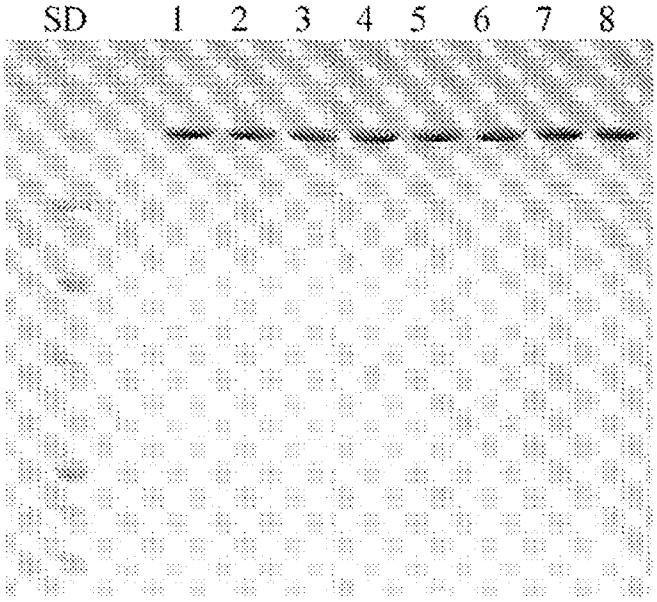


FIGURA 8b

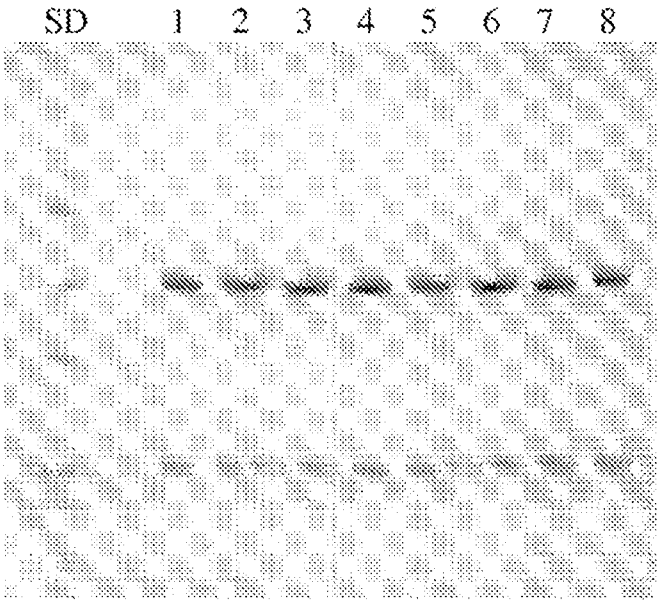


FIGURA 8c

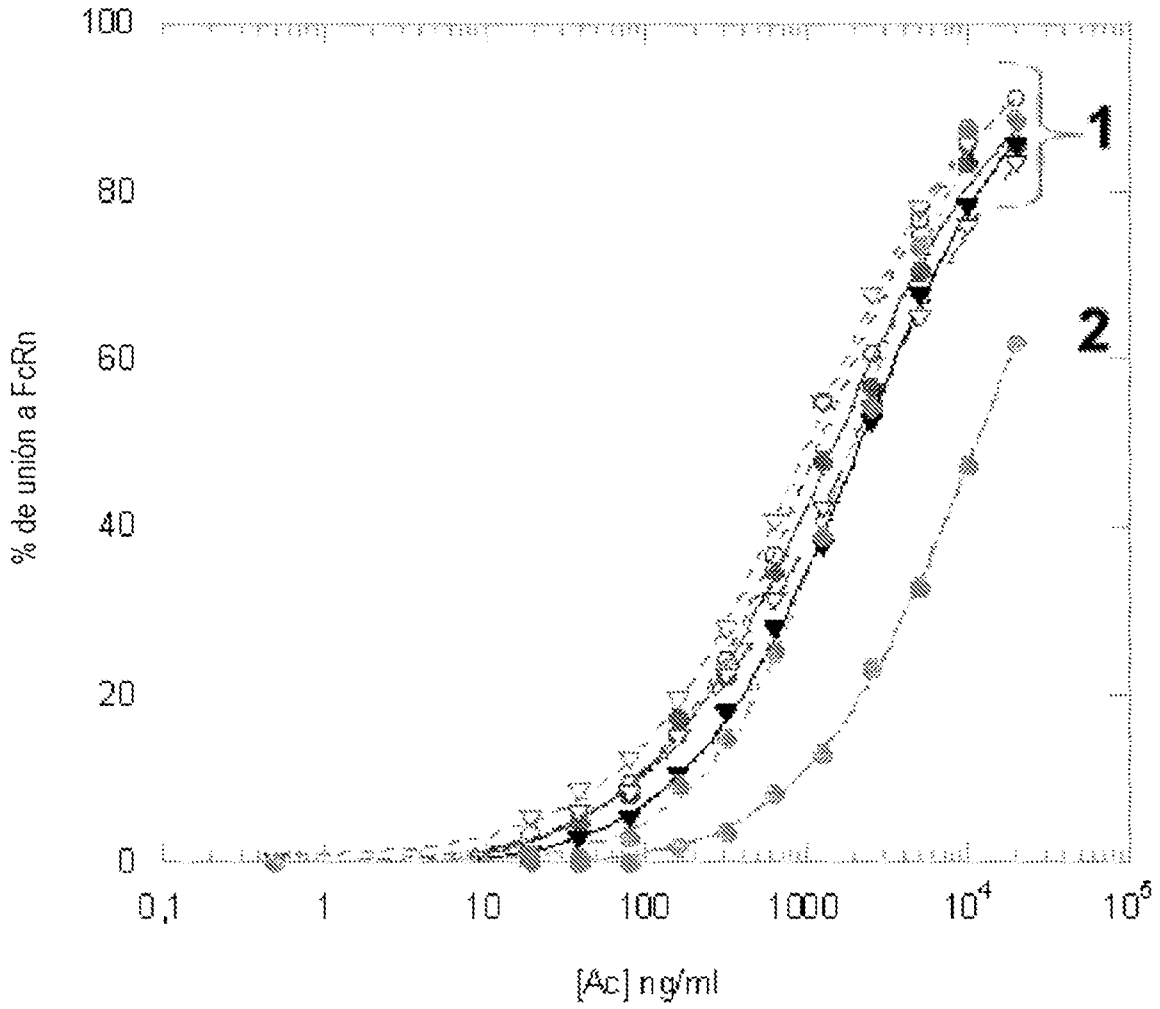

100
80
60
40
20
0
% de unión a FcRn
0,1
1
10
100
1000
10^4
10^5
[Ac] ng/ml
1
2

FIGURA 9

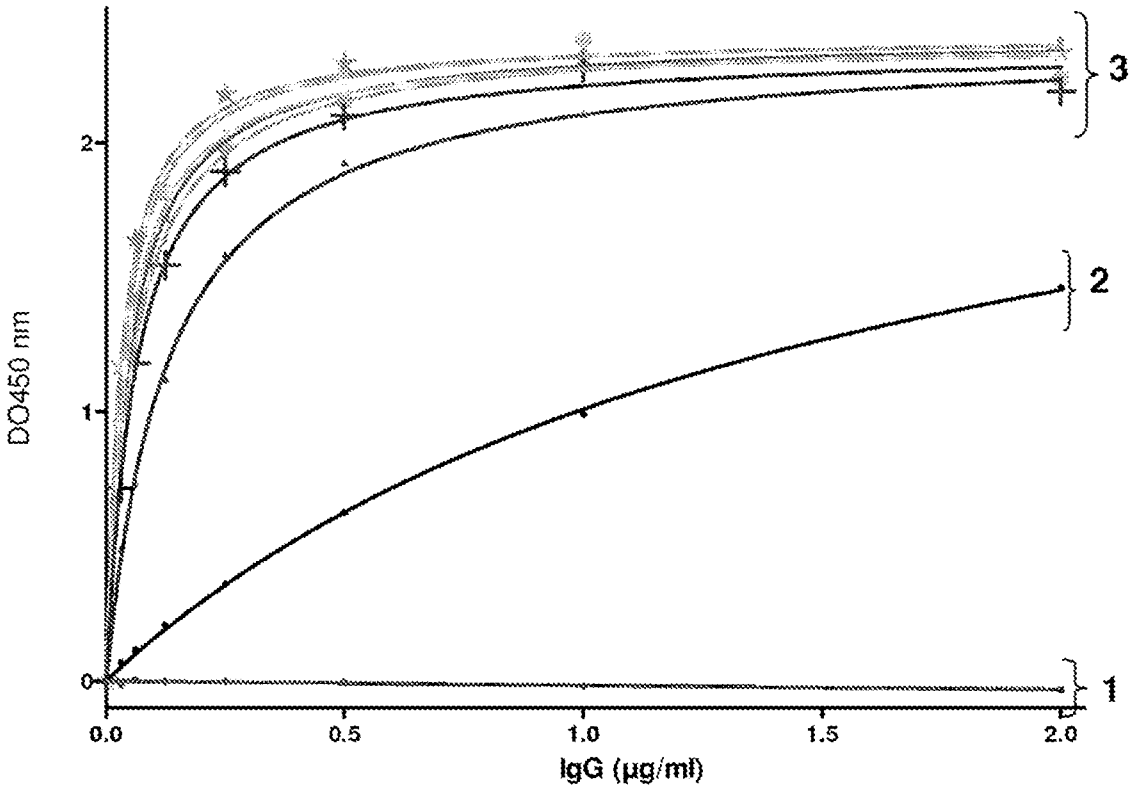


FIGURA 10

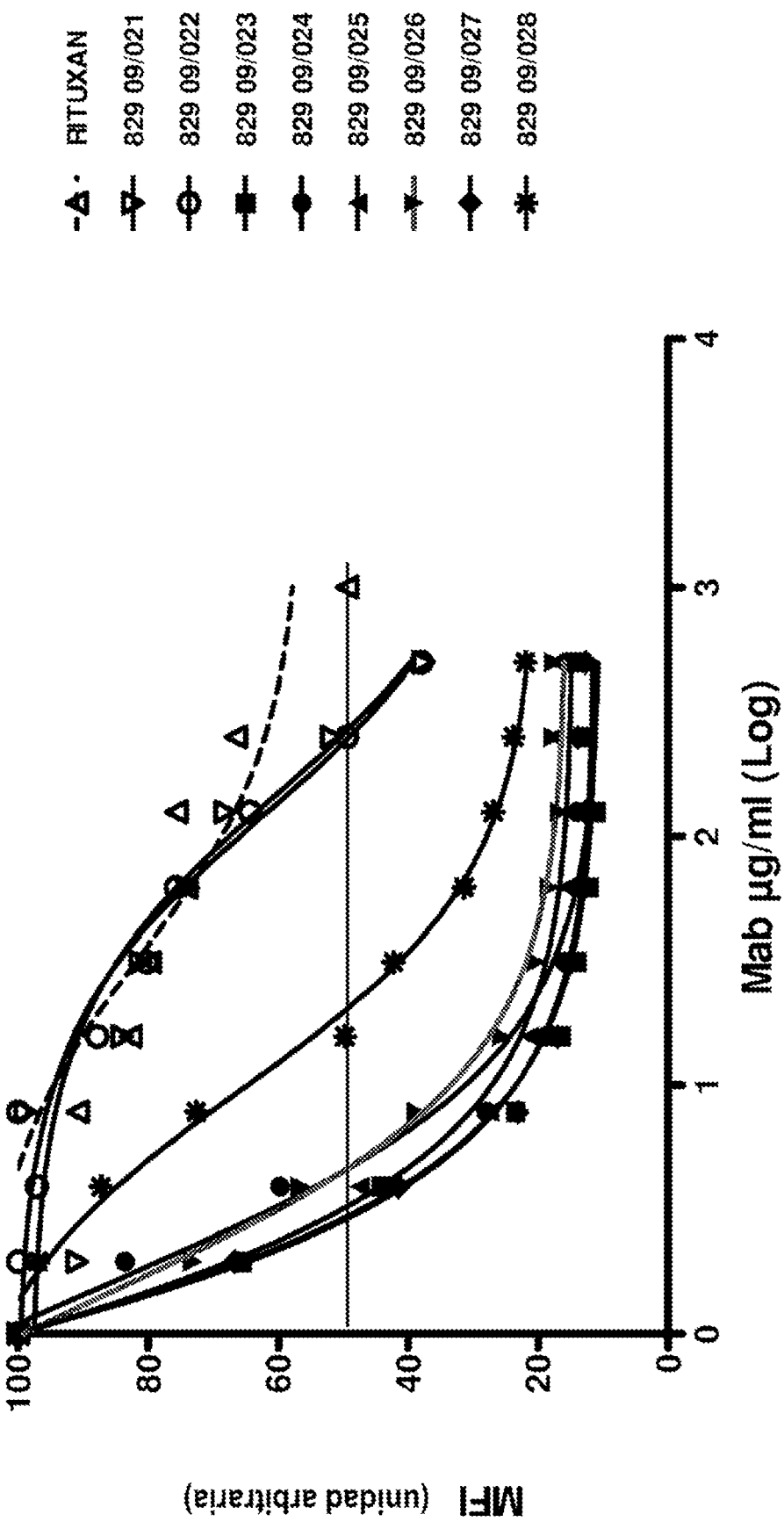

RITUXAN
829 09/021
829 09/022
829 09/023
829 09/024
829 09/025
829 09/026
829 09/027
829 09/028
MFI (unidad arbitraria)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
Mab µg/ml (Log)

FIGURA 11

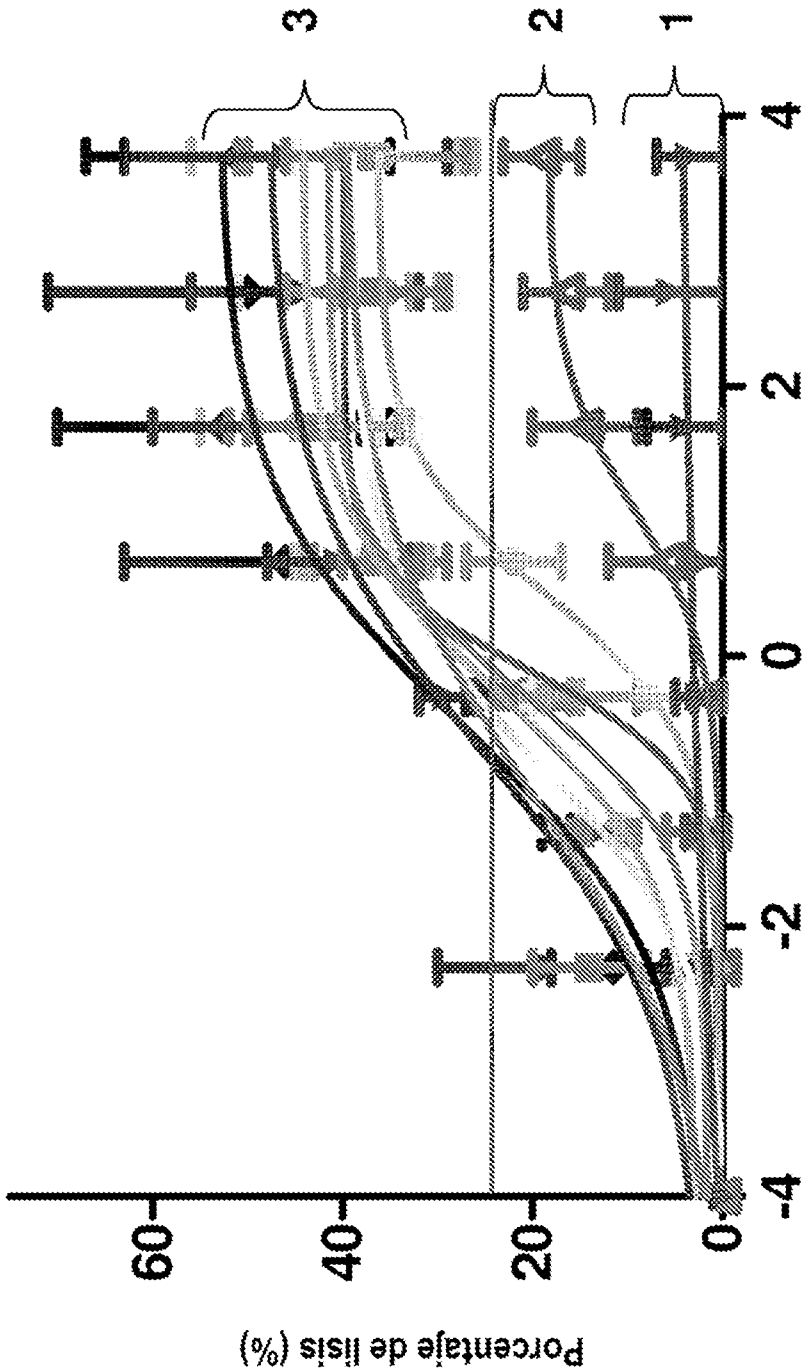


FIGURA 12