



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020015006-1 A2



(22) Data do Depósito: 25/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/12/2020

(54) **Título:** VARIANTES DE FC COM LIGAÇÃO REALÇADA AO FCRN E MEIA-VIDA PROLONGADA

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/00; A61K 39/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 26/01/2018 US 62/622,468.

(71) **Depositante(es):** GENZYME CORPORATION.

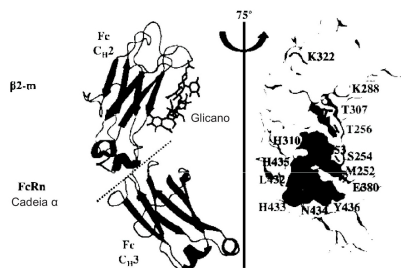
(72) **Inventor(es):** HUAWEI QIU; BRIAN MACKNESS.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019015204 de 25/01/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/147973 de 01/08/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 23/07/2020

(57) **Resumo:** A presente descrição fornece polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos e imunoadesinas) compreendendo um domínio Fc modificado. A presente descrição também fornece ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de ligação, vetores de expressão recombinantes e células hospedeiras para a produção desses polipeptídeos de ligação. Métodos de uso dos polipeptídeos de ligação aqui descritos para tratar a doença são também fornecidos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**VARIANTES DE FC COM LIGAÇÃO REALÇADA AO FCRN E MEIA-VIDA PROLONGADA**”.

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório Norte-Americano No. de Série 62/622.468, depositado em 26 de Janeiro de 2018, cuja descrição completa é aqui incorporada por referência.

ANTECEDENTE

[002] A interação de anticorpos com o receptor Fc neonatal (FcRn) é determinante na manutenção e prolongamento da meia-vida sérica de anticorpos e outras terapêuticas derivadas de Fc. FcRn é um heterodímero de um domínio α do tipo MHC classe I e uma subunidade de β 2-macroglobulina (β 2-m) que reconhece regiões na cadeia pesada do anticorpo Fc distintas de outros receptores Fc γ (Fc γ R γ s). Enquanto FcRn é expresso em vários tecidos, acredita-se que atue principalmente no endotélio vascular, rins e na barreira hematoencefálica, prevenindo a degradação de IgG, excreção e causa de respostas inflamatórias, respectivamente.

[003] A ligação do anticorpo ao FcRn é altamente dependente do pH, e a interação ocorre apenas com alta afinidade (alto nanomolar a baixo micromolar) com pH baixo (pH <6,5), mas não com pH fisiológico (pH aproximadamente 7,4). Após a acidificação do endossoma a um pH menor que 6,5, a interação entre IgG e FcRn se torna altamente favorável e é diretamente responsável por inibir a degradação e promover a reciclagem de anticorpos ligados ao FcRn na superfície celular. O aumento do pH enfraquece a interação e promove a liberação de anticorpos na corrente sanguínea.

[004] A modificação de Fc usando métodos de mutagênese de alto rendimento tem sido amplamente pesquisada para identificar vari-

antes que realçam a afinidade de ligação ao FcRn, pois a ligação realçada presumivelmente levaria a maior eficácia e menor frequência de dosagem para anticorpos terapêuticos como resultado direto de uma meia-vida sérica prolongada em comparação com os anticorpos IgG tipo selvagem. No entanto, variantes que realçam a afinidade de ligação ao FcRn podem ter resultados imprevisíveis. Por exemplo, certas variantes de IgG que mostram grandes aumentos na afinidade de FcRn em pH 6,0, como N434W ou P257I/Q311I, entre outros, têm metade das meias-vidas séricas tipo selvagem ou gravemente reduzidas em estudos com camundongos transgênicos de FcRn de macaco cingolgo e humano (hFcRn) (veja, por exemplo, Kuo et al. 2011 *supra*; Datta-Mannan et al. 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717; e Datta-Mannan et al. 2007, *Metab. Dispos.* 35: 86-94). A variante T250Q/M428L (QL) mostrou resultados específicos da medula óssea de IgG em modelos animais (veja, por exemplo, Datta-Mannan et al. 2007, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717; e Hinton et al. 2006, *J. Immunol.* 176:346-356). A variante M252Y/S254T/T256E (YTE, numeração de EU) mostrou um realce de 10 vezes *in vitro*, mas exibe citotoxicidade mediada por célula (ADCC) dependente de anticorpo diminuída *in vivo* devido a uma redução de 2 vezes na afinidade para o receptor FcγRIIIa (veja, por exemplo, Dall'Acqua et al. 2002 *supra*).

[005] Assim, permanece a necessidade de variantes de Fc alternativas que possuam ligação realçada ao FcRn e meia-vida de circulação prolongada.

SUMÁRIO

[006] A presente invenção é baseada na descoberta de novos anticorpos IgG com uma ou mais das seguintes características: meia-vida sérica aumentada, afinidade de ligação ao FcRn realçada, afinidade de ligação ao FcRn realçada em pH ácido, afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada e estabilidade térmica similar, em comparação

com um anticorpo IgG tipo selvagem.

[007] Por conseguinte, em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, compreendendo um ácido aspártico (D) ou um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256 e/ou um triptofano (W) ou uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que a posição do aminoácido 254 não é treonina (T) e compreende ainda uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434 ou uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, em que as posições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU, é fornecido.

[008] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[009] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano, afinidade de ligação ao FcRn de rato ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0010] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0011] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em compara-

ção com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, uma afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida.

[0012] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é cerca de 7,4.

[0013] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0014] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao FcγRIIIa que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0015] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que

um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos tripla M252Y/S254T/T256E, de acordo com a numeração de EU.

[0016] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

[0017] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0018] Em outros aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma combinação de substituições de aminoácidos em posições selecionadas a partir do grupo que consiste em a) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, b) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434, c) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, d) um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434, e) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434, f) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434, g) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do ami-

noácido 434, h) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434, e i) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434, em que as substituições de aminoácido são fornecidas de acordo com a numeração de EU.

[0019] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0020] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano, afinidade de ligação ao FcRn de rato ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0021] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0022] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em compara-

ção com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, uma afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem menos afinidade de ligação ao FcRn em pH não ácido do que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos dupla M428L/N434S, de acordo com a numeração de EU.

[0023] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é cerca de 7,4.

[0024] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0025] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao

FcγRIIIa que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0026] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos tripla M252Y/S254T/T256E, de acordo com a numeração de EU.

[0027] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

[0028] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0029] Em outros aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo a) uma substituição de aminoácidos dupla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q e T256E/T307W, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434 ou b) uma substituição de aminoácidos tripla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q e M252Y/T256E/T307W, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição

do aminoácido 434, em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

[0030] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0031] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano, afinidade de ligação ao FcRn de rato ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0032] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem.

[0033] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação realçada ao FcRn em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, a afinidade de ligação ao FcRn real-

çada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem menos afinidade de ligação ao FcRn em pH não ácido do que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos dupla M428L/N434S, de acordo com a numeração de EU.

[0034] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é de cerca de 7,4.

[0035] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0036] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao FcγRIIIa que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0037] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc modificado

tendo a substituição de aminoácidos tripla M252Y/S254T/T256E, de acordo com a numeração de EU.

[0038] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

[0039] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0040] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, de acordo com a numeração de EU, é fornecido.

[0041] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0042] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano ou afinidade de ligação ao FcRn de rato ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0043] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0044] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de

ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, a afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida.

[0045] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é cerca de 7,4.

[0046] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0047] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[0048] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0049] Em certos aspectos, uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, é fornecida.

[0050] Em certos aspectos, um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada é fornecido. Em certas modalidades exemplares, o vetor é um vetor de expressão. Em certos aspectos, um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido.

[0051] Em certos aspectos, uma célula hospedeira que compreende o vetor é fornecida. Em certos aspectos, uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão é fornecida.

[0052] Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem mamífera. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem bacteriana.

[0053] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo de ligação isolado, é fornecida.

[0054] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo isolado, é fornecida.

[0055] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, de acordo com a numeração de EU, é fornecido.

[0056] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0057] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano ou afinidade de ligação ao FcRn de rato, ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0058] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0059] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em compara-

ção com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, a afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida.

[0060] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é cerca de 7,4.

[0061] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0062] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[0063] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0064] Em certos aspectos, uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, é fornecida.

[0065] Em certos aspectos, um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada é fornecido. Em certas modalidades exemplares, o vetor é um vetor de expressão. Em certos aspectos, um vetor

de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido.

[0066] Em certos aspectos, uma célula hospedeira que compreende o vetor é fornecida. Em certos aspectos, uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão é fornecida.

[0067] Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem mamífera. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem bacteriana.

[0068] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo de ligação isolado, é fornecida.

[0069] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo isolado, é fornecida.

[0070] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, de acordo com a numeração de EU, é fornecido.

[0071] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0072] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano ou afinidade de ligação ao FcRn de rato, ou igualmente afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0073] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0074] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Em certas modalidades exemplares, a afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida.

[0075] Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, um pH ácido é cerca de 6,0 e um pH não ácido é cerca de 7,4.

[0076] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0077] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[0078] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos humanos.

[0079] Em certos aspectos, uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, é fornecida.

[0080] Em certos aspectos, um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido. Em certas modalidades exemplares, o vetor é um vetor de expressão. Em certos aspectos, um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido.

[0081] Em certos aspectos, uma célula hospedeira que compreende o vetor é fornecida. Em certos aspectos, uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão, é fornecida.

[0082] Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem mamífera. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem bacteriana.

[0083] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo de ligação isolado, é fornecida.

[0084] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo isolado, é fornecida.

[0085] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende uma combinação de pelo menos quatro substituições de aminoácidos compreendendo: um ácido aspártico (D) ou um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, e um triptofano (W) ou uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que a posição do aminoácido 254 não é treonina (T) e compreendendo ainda: uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, em que as posições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[0086] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado com uma combinação de substituições de aminoácidos em posições selecionadas a partir do

grupo que consiste em: a) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; b) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; c) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; d) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434; e) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, em que as substituições de aminoácidos de acordo com a numeração de EU, são fornecidas.

[0087] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo: uma substituição de aminoácidos quádrupla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F e M252Y/T256D/T307W/N434Y, em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[0088] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[0089] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn de rato. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

[0090] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[0091] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0092] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0093] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um do-

mínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0094] Em certas modalidades exemplares, o pH ácido é de cerca de 6,0. Em certas modalidades exemplares, o pH não ácido é de cerca de 7,4.

[0095] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0096] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0097] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um

polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[0098] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

[0099] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos.

[00100] Em certos aspectos, uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, é fornecida.

[00101] Em certos aspectos, um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido.

[00102] Em certas modalidades exemplares, o vetor é um vetor de expressão.

[00103] Em certos aspectos, uma célula hospedeira que compreende o vetor, é fornecida.

[00104] Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem mamífera. Em certas modalidades exemplares, a célula hospedeira é de origem bacteriana.

[00105] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo de ligação isolado, é fornecida.

[00106] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo isolado, é fornecida.

[00107] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[00108] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[00109] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[00110] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[00111] Em certos aspectos, um polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU, é fornecida.

[00112] Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado. Em certas modalidades exemplares, o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

[00113] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano.

[00114] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[00115] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[00116] Em certas modalidades exemplares, o pH ácido é de cerca de 6,0 e o pH não ácido é de cerca de 7,4.

[00117] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em

comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[00118] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida como um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

[00119] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades exemplares, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[00120] Em certas modalidades exemplares, o polipeptídeo de ligação isolado liga-se especificamente a um ou mais alvos.

[00121] Em certos aspectos, uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, é fornecida.

[00122] Em certos aspectos, um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico isolada, é fornecido.

[00123] Em certos aspectos, uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão, é fornecida.

[00124] Em certos aspectos, uma composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo de ligação isolado, é fornecida.

[00125] Em certos aspectos, um método de tratamento de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica, é fornecido.

[00126] Em certas modalidades exemplares, a doença ou distúrbio é um câncer. Em certas modalidades exemplares, o câncer é um tumor.

[00127] Em certas modalidades exemplares, a doença ou distúrbio é um distúrbio autoimune.

[00128] Em certos aspectos, um método de tratamento de um câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado, ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica, é fornecida.

[00129] Em certos aspectos, um método de tratamento de um distúrbio autoimune em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica, é fornecido.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00130] As características e vantagens anteriores e outras da presente invenção serão bem mais compreendidas a partir da descrição detalhada a seguir de modalidades ilustrativas empregadas em conjunto com os desenhos acompanhantes.

[00131] **Figura 1A - Figura 1B** representa a estrutura de um FcRn interagindo com uma região Fc de IgG1. A Figura 1A apresenta uma interação entre hFcRn e um IgG1 Fc (pdb: 4n0u) mostrando um monômero de Fc (fita cinza escuro), incluindo a glicosilação mostrada como bastões marcados por "Glicano", em complexo com as subunidades de hFcRn de domínio α (cinza) e β 2-m (cinza claro). A maioria dos resíduos de anticorpos envolvidos na interação com FcRn está localizada nas alças diretamente adjacentes à interface C_H2-C_H3 (linha

pontilhada) e oposta ao sítio de glicosilação. A Figura 1B representa uma representação de superfície da estrutura de cristal de IgG1 Fc (pdb: 5d4q) girada 75° em relação à Figura 1A. A interface de ligação ao FcRn é composta por resíduos nos domínios C_H2 e C_H3. A biblioteca de saturação foi construída nas onze posições mostradas como bastões, conforme indicado: M252; I253; S254; T256; K288; T307; K322; E380; L432; N434 e Y436. Todos esses resíduos estão próximos ou em contato direto com o FcRn. As superfícies dos resíduos críticos da histidina responsáveis pela dependência do pH (H310, H433, H435) aglomeram-se perto das posições de interesse e são como indicadas.

[00132] **Figura 2A – Figura 2D** representam o ensaio e os resultados do rastreamento Octet. A Figura 2A apresenta esquematicamente um ensaio de rastreamento Octet. Os biossensores de NiNTA capturam o antígeno marcado com histidina e, posteriormente, as variantes de anticorpo para a cinética de ligação ao FcRn de rato (rFcRn). A Figura 2B mostra os perfis cinéticos de ligação ao rFcRn em pH 6,0 da variante tipo selvagem (sólido), T307A/E380A/N434A (AAA) (traços curtos), LS (traços curtos intercalados por ponto único), YTE (traços longos), anticorpos H435A (traços longos intercalados por ponto único) e H310A/H435Q (traços longos intercalados por dois pontos), alinhados ao início da fase de associação do rFcRn. As variantes H435A e H310A/H435Q mostraram pouca ou nenhuma ligação ao FcRn. A variante YTE tem a menor taxa de dissociação de FcRn examinada no ensaio de ligação ao rFcRn Octet. A Figura 2C representa graficamente a normalização da cinética de ligação ao FcRn em pH 6,0 por um subconjunto de mutantes obtidos na classificação Octet. A maioria dos mutantes manteve uma ligação significativa ao rFcRn, mas vários se assemelhavam ao controle simulado (linha pontilhada), indicando a perda de toda a ligação ao rFcRn (traços longos, localizados abaixo da

linha pontilhada (simulação)). Duas variantes (linhas sólidas) tiveram taxa de dissociação mais baixas de rFcRn do que o anticorpo tipo selvagem (traços longos, espessos). A Figura 2D representa uma análise de gráfico de dispersão das taxas de dissociações de rFcRn para todas as mutações pontuais, com cinética observável de ligação ao rFcRn separada pela posição do resíduo. As variantes de saturação caíram em um dos quatro regimes taxa de dissociação de rFcRn: sem ligação (não mostrada), ligação mais rápida (preto), ligação similar a tipo selvagem (branco), ligação mais lenta (cinza). Dezoito mutantes mostraram uma taxa de dissociação significativamente menor de rFcRn do que o anticorpo tipo selvagem (linhas tracejadas pretas).

[00133] **Figura 3** representa graficamente a cinética Biacore de variantes de referência e tipo selvagem com FcRns humano e de rato em pH 6,0 e pH 7,4. Todas as curvas de ligação ao FcRn para as séries de concentração tipo selvagem (esquerda superior), variante AAA (direita superior), variante M428/N434S (LS) (esquerda inferior) e variante M252Y/S254T/T256E (YTE) (direita inferior) são mostradas para cada FcRn humano (primeira e terceira colunas) e rato (segunda e quarta colunas) em pH 6,0 (primeira e terceira fileiras) e pH 7,4 (segunda e quarta fileiras). As variantes AAA, LS e YTE apresentaram taxa de dissociações mais baixas de FcRn do que o anticorpo tipo selvagem. Em geral, os anticorpos ligam o rFcRn com uma afinidade aumentada de aproximadamente 10 vezes em comparação com o tipo selvagem. A variante LS teve a afinidade mais apertada em pH 7,4 e a maior ligação residual em pH 7,4 ao hFcRn, enquanto rFcRn ligou mais fortemente a variante YTE.

[00134] **Figura 4A** representa graficamente a cinética Biacore das variantes de saturação de derivação com FcRn humano e de rato em pH 6,0. Traços cinéticos de ligação ao FcRn da série de concentrações para as 18 variantes de saturação de derivação são mostrados.

M252Y, T256D, T256E, N434F, N434P, N434Y, T307A, T307E, T307F, T307Q e T307W tiveram taxa de dissociação mais baixas de FcRn igualmente de humano e de rato. As demais variantes foram específicas apenas para FcRn de rato.

[00135] **Figura 4B** representa graficamente a cinética de ligação ao FcRn das variantes de saturação isolada de derivação, de referência e WT com FcRn humano em pH 6,0. Sensogramas de ligação ao FcRn com uma série de concentrações de WT, LS, YTE e as 18 variantes de saturação com FcRn humano em pH 6,0. As variantes de saturação isolada usadas para a biblioteca de combinações estão sublinhadas e em negrito.

[00136] **Figura 5A - Figura 5D** descrevem dados mostrando que múltiplas variantes têm taxa de dissociações mais lentas de FcRn igualmente de humano e de rato em pH 6,0. Figs. 5A e 5B representam sensogramas de Biacore de várias variantes. A Figura 5A representa as taxas de dissociações de FcRn humano em pH 6,0 para a variante YTE (traços longos intercalados por ponto único), variante LS (traços longos intercalados por dois pontos, tipo selvagem (WT; linha pontilhada) e variantes de saturação de derivação (derivação; linhas sólidas em vários tons). Na Figura 5A, os sensogramas normalizados são representados mostrando taxa de dissociações de hFcRn melhoradas em comparação com o WT. A Figura 5B mostra as taxa de dissociações de FcRn de rato em pH 6,0 para a variante AAA (pontilhada), variante LS (traços intercalados por dois pontos), variante YTE (traços intercalados por ponto único), tipo selvagem (linha sólida) e variantes de saturação de derivação (linhas tracejadas em várias frequências e espessuras). Uma injeção representativa de cada um dos onze anticorpos principais é mostrada para maior clareza. Essas variantes isoladas de derivação mostraram uma cinética taxa de dissociação melhorada do FcRn igualmente de humano e de rato em compa-

ração com o tipo selvagem. A Figura 5C e a Figura 5D representam gráficos de afinidade de ligação para as variantes de anticorpo de saturação de derivação (círculos brancos) e tipo selvagem (círculo preto) para FcRn humano (Figura 5C) e de rato (Figura 5D) usando o *on* e taxa de dissociações obtidas a partir de medições cinéticas Biacore. As variantes de referência são mostradas: AAA (linhas diagonais voltadas para a direita inferior), LS (pontilhadas) e YTE (linhas diagonais voltadas para a esquerda inferior). Apesar da melhora na taxa de dissociação de FcRn, a maioria das variantes não tinha uma afinidade mais estreita para FcRn humano ou de rato, devido à cinética de associação mais lenta. Onze variantes tiveram taxa de dissociações mais baixas de ambas as espécies de FcRn.

[00137] **Figura 6A - Figura 6D** representam dados mostrando que as combinações das mutações de saturação de derivação melhoraram ainda mais as taxa de dissociações de FcRn e as afinidades de ligação. Figura 6A e Figura 6B representam os sensogramas Biacore representativos mostrando as taxa de dissociações de FcRn para FcRn humano e de rato, respectivamente. A Figura 6A representa sensogramas normalizados para FcRn humano de uma variante representativa das variantes de combinação única (linha tracejada), dupla (linha cinza clara sólida), tripla (linha cinza sólida) e quádrupla (linha preta sólida) em comparação com as variantes tipo selvagem (linha pontilhada) e LS (traços longos intercalados por dois pontos). A Figura 6B representa sensogramas normalizados para FcRn de rato de uma variante representativa das variantes de combinação única (traços longos intercalados por dois pontos), dupla (traços longos intercalados por ponto único), tripla (traços longos) e quádrupla (traços curtos) em comparação com a variante tipo selvagem (linha pontilhada) e YTE (linha sólida). A incorporação de múltiplas mutações diminuiu a taxa de dissociação e realçou a afinidade de ligação para FcRn em maior ex-

tensão do que as variantes de referência. A Figura 6C e a Figura 6D representam gráficos de variantes de saturação combinadas mostrando taxa de associação como uma função de taxa de dissociação para FcRn humano (Figura 6C) ou de rato (Figura 6D), que revelou que a maioria das variantes possuía ligação realçada ao FcRn em pH 6,0 em comparação com as variantes de referência. As variantes de ligação mais apertadas ao FcRn humano e de rato foram as combinações quádrupla e dupla, respectivamente.

[00138] **Figura 7A - Figura 7D** representa os dados mostrando que a ligação ao FcRn realçada em pH 6,0 interrompeu a dependência de pH da interação. Figura 7A e Figura 7B, representa sensogramas representativos da cinética de ligação ao FcRn Biacore em pH 7,4 das variantes de combinação única (traços longos intercalados com dois pontos), dupla (traços longos intercalados com ponto único), tripla (traços longos) e quádrupla (traços curtos) em comparação a tipo selvagem (pontilhada), e a variante LS (Figura 7A, linha sólida) e a variante YTE (Figura 7B, linha sólida). Aumentar o número de mutações de realce de ligação ao FcRn resultou na maior ligação residual em pH fisiológico, com a maioria das variantes dupla, tripla e quádrupla mostrando forte ligação a ambas as espécies de FcRn. A Figura 7C e a Figura 7D representam gráficos do estado estacionário (
$$RU = \text{offset} + \frac{(R_{\text{max}} - \text{offset}) *}{[\text{Antibody}] +}$$
 (Equação 2)) de todas as variantes de saturação para FcRn humano (Figura 7C) ou de rato (Figura 7D) em pH 7,4 em função da afinidade de ligação em pH 6,0. Na Figura 7C, a comparação da ligação ao FcRn residual em pH 7,4 com a afinidade de ligação ao FcRn em pH 6,0 é mostrada. As combinações de derivação com propriedades de ligação ao FcRn melhorados ocupam o quadrante esquerdo inferior definido pela variante de referência LS (diamante). Na Figura 7D, as variantes LS (diamante) e YTE (triângulo) servem como pontos de corte para validação de derivação, respecti-

vamente. Estas duas variantes tinham a afinidade de ligação mais apertada em pH 6,0 e a maior ligação residual em pH 7,4 para FcRn humano e de rato, respectivamente. Em ambas Figuras 7C e 7D, variantes únicas (círculos brancos), dupla (círculos cinza claro), tripla (círculos cinza escuro) e quádrupla (círculos pretos), bem como a variante YTE (triângulo) são mostradas.

[00139] **Figura 8A - Figura 8C** representa dados obtidos por cromatografia de afinidade com FcRn e fluorimetria de varredura diferencial (DSF) das variantes de referência. Figura 8A representa os perfis de eluição normalizados para as variantes WT (linha preta sólida), AAA (linha pontilhada), LS (traços longos intercalados por dois pontos), YTE (traços longos intercalados por ponto único), H435A (linha cinza clara sólida) e H310A/H435Q (AQ; linha cinza escura sólida). O pH é anotado na parte superior do gráfico. As variantes nulas de ligação ao FcRn (H435A, H310A/H435Q) não se ligam à coluna e eluem no fluxo total (<10 mL). As variantes AAA, LS e YTE eluem em pH mais alto que o anticorpo WT. A Figura 8B representa perfis de DSF das variantes WT (preto), LS (cinza) e YTE (cinza escuro). YTE foi desestabilizada em comparação com WT e LS. A Figura 8C mostra os perfis de eluição da coluna de afinidade com FcRn das sete variantes únicas de derivação usadas para as variantes de combinação em comparação com as variantes WT e LS (pontilhadas na vertical). Duas variantes (N434F/Y) são eluídas em um pH mais alto que LS, significando uma dependência de pH reduzida na interação com FcRn para variantes que contêm essas mutações.

[00140] **Figura 9A - Figura 9D** representa os dados mostrando que as variantes de combinação perturbaram significativamente a dependência do pH e a estabilidade térmica. A Figura 9A representa cromatogramas de afinidade de FcRn representativos de variantes única (traços longos intercalados por dois pontos), dupla (traços longos in-

tercalados por ponto único), tripla (traços longos) e quádrupla (traços curtos). Aumentar o número de mutações de realce de ligação ao FcRn mudou a eluição para valores de pH mais altos; variante LS (pequena linha vertical pontilhada). A Figura 9B representa um gráfico de caixa do pH de eluição para as variantes de saturação e de combinação de derivação, incluindo os mutantes único (círculos brancos), duplo (linhas horizontais), triplo (linhas verticais) e quádruplo (quadriculado), o que indica uma tendência para valores de pH mais altos com um número crescente de mutantes de realce de FcRn. A Figura 9C mostra que a alta correlação ($R^2 = 0,94$) entre o pH da eluição da cromatografia de afinidade com FcRn e a taxa de dissociação de hFcRn usando Biacore revelou uma perda na dependência do pH da interação anticorpo-FcRn com a cinética de dissociação de FcRn melhorada. As variantes AAA (linhas diagonais voltadas para a direita inferior), LS (pontilhada) e YTE (linhas diagonais voltadas para a esquerda inferior) tiveram taxa de dissociações de hFcRn e valores de pH de eluição semelhantes às variações duplas. A Figura 9D representa um gráfico de caixa do T_m obtido a partir de DSF das variantes de saturação de combinação que revelou que mutações de realce de ligação ao FcRn adicionais desestabilizam o anticorpo em comparação com as variantes WT, única ou de referência.

[00141] **Figura 10A - Figura 10B** representa os dados obtidos da cromatografia de afinidade com FcRn e DSF de sete variantes de derivação. Figura 10 representa a cromatografia de afinidade com FcRn das variantes M252Y (linha sólida), T256D (traços curtos intercalados com ponto único), T256E (traços longos), T307Q (traços longos intercalados com ponto único), T307W (traços longos intercalados com dois pontos), N434F (pontilhados) e N434Y (traços curtos). Os cromatogramas revelaram uma mudança no pH da eluição em comparação com os anticorpos tipo selvagem e LS (linhas pontilhadas verticais).

N434F e N434Y tiveram um pH de eluição mais alto (pH de aproximadamente 8,3) do que a variante LS (linha pontilhada vertical). O pH em certos volumes de eluição é indicado acima dos cromatogramas para referência. A Figura 10B mostra perfis de DSF de sete variantes de derivação, que mostraram que nenhuma das sete variantes de derivação únicas desestabilizou os anticorpos na mesma extensão que a variante YTE (linha pontilhada vertical). Todas as variantes, exceto T307Q (traços longos intercalados com ponto único), foram desestabilizadas em comparação com WT (linha pontilhada vertical).

[00142] **Figura 11A - Figura 11C** representa dados mostrando que a ligação ao FcγRIIIa foi reduzida nas variantes de combinação contendo M252Y. A Figura 11A mostra os sensogramas de ligação ao FcγRIIIa das variantes WT (preto), LS (cinza) e YTE (cinza escuro) que revelaram uma resposta de ligação reduzida pela variante YTE. Figura 11B representa um gráfico de caixa das respostas de ligação ao FcγRIIIa das variantes de referências, únicas e de combinação, como indicado. As variantes com as mutações M252Y contêm uma resposta de ligação reduzida ao FcγRIIIa, incluindo todas as variantes quádruplas. Combinações com N434F/Y normalmente mostram uma resposta aumentada com FcγRIIIa. A Figura 11C representa as respostas de ligação ao FcγRIIIa das sete variantes únicas de derivação, em comparação com as variantes WT e YTE (pontilhadas na horizontal). A mutação M252Y mostra uma ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com a WT, enquanto seis mostram uma ligação semelhante a WT ou aumentada a este receptor.

[00143] **Figura 12A - Figura 12D** representa os dados obtidos da cromatografia de afinidade com FcRn, DSF e ligação ao FcγRIIIa de sete variantes de combinação de derivação. A Figura 12 representa os cromatogramas de afinidade de FcRn de sete variantes de combinação de derivação em comparação com o anticorpo tipo selvagem e a

variante LS (linha pontilhada vertical e linha vertical sólida, respectivamente). Cada variante de derivação tinha um pH de eluição próximo à variante LS. A Figura 12B mostra perfis de DSF das variantes da combinação de derivação em comparação com as variantes YTE e tipo selvagem (linhas pontilhadas verticais, como indicado). Seis das sete variantes de derivação tinham um T_m que era semelhante ou mais desestabilizado que a variante YTE: MDWN (traços longos intercalados por dois pontos); YTWN (traços longos); YDTN (linha sólida); YETN (traços longos intercalados por ponto único); YDQN (pontilhado); YEQN (traços curtos intercalados por ponto único). A variante MDQN tinha um T_m semelhante ao anticorpo tipo selvagem (traços curtos). A Figura 12C mostra os sensogramas Biacore da cinética de ligação ao FcγRIIIa das sete variantes de derivação em comparação com a variante tipo selvagem (linha pontilhada maior) e YTE (traços longos espessos). As variantes contendo M252Y, YDTN (linha sólida), YDQN (traços curtos intercalados por ponto único), YTWN (traços longos), YETN (traços longos intercalados por ponto único) e YEQN (linha pontilhada menor), cada uma possuía um RU em estado estacionário reduzido de maneira semelhante à YTE. (D) mostra RU em estado estacionário das sete variantes de derivação, tipo selvagem e variante YTE. Apenas as variantes MDWN e MDQN possuíam uma afinidade semelhante para FcγRIIIa como o anticorpo tipo selvagem.

[00144] **Figura 12E - Figura 12H** representam dados mostrando que três variantes de derivação exibiram uma faixa de atributos chave de anticorpo. A Figura 12E mostra os perfis de eluição por cromatografia de afinidade com FcRn das variantes DQ (sólida), DW (pontilhada) e YD (tracejada) em comparação com WT e LS (linhas pontilhadas verticais). Cada variante dupla mostrou um pH de eluição entre WT e LS. A Figura 12F representa os perfis de fluorescência DSF das três variantes em comparação com as variantes YTE e WT (pontilhadas

verticalmente) revelaram que YD (tracejada) e DW (pontilhada) foram desestabilizadas levemente em comparação com YTE, mas DQ (sólida) era semelhante a WT. A Figura 12G representa os sensogramas de ligação ao FcγRIIIa em comparação com WT e YTE (pontilhado horizontal). YD (tracejado) apresentou uma resposta de ligação semelhante ao YTE, enquanto DQ (sólido) e DW (pontilhado) apresentaram uma ligeira redução em comparação com o WT. A Figura 12H representa dados mostrando que o RF ELISA de ligação em ponte homogêneo revelou as três variantes de derivação e YTE representou ligação de RF significativamente reduzida ou semelhante ao WT, ao contrário de LS. **p<0,001, *p<0,01.

[00145] **Figura 13A - Figura 13D** representa dados que apresentam uma comparação da cinética de ligação ao FcRn das variantes da combinação de derivação em pH 6,0 e pH 7,4. A Figura 13A e a Figura 13B mostram os sensogramas de ligação ao FcRn Biacore de variantes de combinação de derivação para FcRn humano (Figura 13A) ou FcRn de rato (Figura 13B) em comparação com o tipo selvagem (linha pontilhada) e LS (hFcRn, Figura 13A, traços longos espessos) ou YTE (rFcRn, Figura 13B, traços longos espessos) em pH 6,0. Cada variante de combinação tinha uma afinidade de ligação mais estreita geral com o respectivo FcRn, apesar das *on* e taxa de dissociações alteradas. A Figura 13C e a Figura 13D mostram os sensogramas de FcRn Biacore em pH 7,4. Cada variante de derivação de hFcRn teve uma resposta de ligação ao FcRn em estado estacionário semelhante ou reduzida em comparação com a variante LS. Somente as variantes MDQN e MDWN mostraram menos ligação ao rFcRn em pH 7,4 que a variante YTE.

[00146] **Figura 14** é uma tabela que descreve Taxas de dissociação de Ligação ao rFcRn Octet de uma Biblioteca de Saturação de acordo com certas modalidades. As espécies tipo selvagem (WT) e semelhan-

tes a tipo selvagem (tipo WT) são indicadas por retângulos brancos; As espécies WT são como indicadas. As variantes com pouca ou nenhuma ligação ao rFcRn em comparação com a tipo selvagem são indicadas por retângulos cinza escuro. As variantes com taxa de dissociação de rFcRn mais rápida em comparação com a tipo selvagem são indicadas por retângulos cinza claro, e as variantes com taxas de rFcRn mais lentas em comparação com a tipo selvagem são indicadas por retângulos pretos.

[00147] **Figura 15A - Figura 15C** representam um novo ensaio de ligação desenvolvido usando um chip sensor CM5. A Figura 15A é um esquema do ensaio. A Figura 15B mostra a imobilização direta de FcRn. A Figura 15C mostra a captura de estreptavidina de FcRn biotilado.

[00148] **Figura 16A - Figura 16B** representam a ligação ao FcRn do Anticorpo-2 em pH 6,0. A Figura 16A representa FcRn humano. A Figura 16B representa FcRn de camundongo.

[00149] **Figura 17A - Figura 17B** representam a ligação ao FcRn do Anticorpo-2 em pH 7,4. A Figura 17A representa FcRn humano. A Figura 17B representa FcRn de camundongo.

[00150] **Figura 18** representa graficamente a dependência do pH de várias variantes do Anticorpo-2. As variantes de derivação mantiveram uma afinidade de ligação mais alta em pH 6 e uma ligação residual mais baixa em pH 7,4 que LS.

[00151] **Figura 19** representa uma comparação da dependência do pH de ligação ao FcRn usando as cadeias principais do Anticorpo-1 e Anticorpo-2.

[00152] **Figura 20** representa uma comparação da estabilidade térmica usando as cadeias principais do Anticorpo-1 e Anticorpo-2.

[00153] **Figura 21** representa uma comparação da ligação ao FcγRIIIa usando as cadeias principais do Anticorpo-1 e Anticorpo-2.

[00154] **Figura 22A - Figura 22I** representam múltiplas plotagens mostrando que as variantes DQ, DW e YD eram transferíveis entre as cadeias principais de IgG1. As plotagens a-c representam os sensoogramas de ligação ao FcRn normalizados em pH 6,0 em três cadeias principais de IgG1 com as variantes WT (cinza claro), LS (cinza escuro), DQ (preto sólido), DW (pontilhada) e YD (tracejada) mostrando cinética semelhante a baixo pH. Essas três variantes, DQ, DW e YD, possuíam *on* e taxa de dissociações um pouco mais rápidas do que a variante LS, mas mantinham uma afinidade de ligação ao FcRn mais estreita. As plotagens d-f representam os sensoogramas de ligação ao FcRn em pH 7,4; variante de referência LS (preto sólido). As plotagens g-i representam a resposta de ligação ao FcRn em pH 7,4 em comparação com a afinidade de ligação em pH 6,0 para cada cadeia principal de anticorpo com as variantes WT (cinza), LS (cinza escuro), DQ (preto sólido), DW (vazio) e YD (quadrado vazio). DQ, DW e YD mostram características de FcRn melhoradas, com ligação realçada em pH 6,0 e ligação mínima em pH 7,4.

[00155] **Figura 23A - Figura 23C** mostra que as três variantes de derivação na cadeia principal de mAb2 melhoram de maneira semelhante a ligação ao FcRn de cinomolgo. A **Figura 23A** mostra sensoogramas de ligação ao cFcRn normalizados em pH 6,0 de WT (cinza), LS (cinza escuro), DQ (preto sólido), DW (pontilhado) e YD (tracejado) mostrando cinética e afinidades de ligação semelhantes como hFcRn. A Figura 23B mostra que a resposta de ligação ao cFcRn para as três variantes foi drasticamente reduzida em pH fisiológico; LS (cinza escuro), mas mostrou maior ligação do que WT (cinza) de maneira semelhante ao hFcRn. **Figura 23C** representa uma comparação da resposta de ligação ao cFcRn residual em pH 7,4 com a afinidade de ligação ao cFcRn em pH 6,0 de WT (cinza), LS (cinza escuro), DQ (preto sólido), DW (vazio) e YD (quadrado vazio), revelando que todas as três

variantes mantiveram as propriedades de ligação ao FcRn melhoradas observadas com o hFcRn.

[00156] **Figura 24A - Figura 24B** mostram que as variantes de derivação prolongaram a meia-vida sérica do anticorpo. Perfis farmacocinéticos da concentração de anticorpos no plasma como uma função do tempo em macaco cinomolgo (Figura 24A) e camundongo transgênico de hFcRn (Figura 24B) dos anticorpos WT (círculos pretos com linha preta sólida), LS (círculos brancos com linha preta tracejada), DQ (círculos cinza claro com linha cinza clara sólida), DW (círculos cinza escuro com linha cinza escura sólida) e YD (círculos pretos com linha preta pontilhada). Todas as três variantes de derivação prolongam a meia-vida do anticorpo em comparação com TP.

[00157] **Figura 25** descreve um gráfico de RU em estado estacionário de todas as variantes de saturação para o FcRn humano em pH 7,4 como uma função da afinidade de ligação em pH 6,0. A comparação da ligação ao FcRn residual em pH 7,4 com a afinidade de ligação ao FcRn em pH 6,0 é mostrada. Combinações quádruplas com propriedades de ligação ao FcRn melhoradas igualmente em pH 6,0 e pH 7,4 são mostradas em caixas no quadrante direito superior da plotagem. As variantes únicas (círculos brancos), dupla (círculos cinza claro), tripla (círculos cinza escuro) e quádrupla (círculos pretos), bem como as variantes de referência AAA, LS e YTE (como indicado) são mostradas.

[00158] **Figura 26** representa um esquema do método de captura de Biotina usado para capturar o FcRn biotilado.

[00159] **Figura 27** representa plotagens mostrando a cinética de ligação ao FcRn humano em pH 6,0 das variantes de referência YTEKF e de combinação, conforme indicado.

[00160] **Figura 28A - Figura 28B** mostra a cinética de ligação ao FcRn das variantes de combinação em comparação com a de referên-

cia YTEKF em pH 6,0 (Figura 28A) e em pH 7,4 (Figura 28B). A tipo selvagem é indicada por uma linha preta sólida (WT) e a de referência YTEKF é indicada por uma linha pontilhada.

[00161] **Figura 29** descreve uma plotagem de RU em estado estacionário de variantes selecionadas para o FcRn humano em pH 7,4 como uma função da afinidade de ligação em pH 6,0 em comparação com a de referência YTEKF. Várias variantes (variantes quádruplas de derivação) exibiram afinidade de ligação realçada ao FcRn humano em pH 6,0 e pH 7,4 em relação a de referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00162] A presente descrição fornece polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos) tendo afinidades de ligação ao receptor neonatal de Fc (FcRn) alteradas. Em certas modalidades, os polipeptídeos de ligação compreendem um domínio Fc modificado que realça a afinidade de ligação ao FcRn em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem (por exemplo, não modificado). A presente descrição também fornece ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de ligação, vetores de expressão recombinantes e células hospedeiras para a produção de polipeptídeos de ligação e composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos de ligação aqui descritos. Métodos de uso dos polipeptídeos de ligação da presente descrição para tratar doenças também são fornecidos.

[00163] Os domínios Fc das imunoglobulinas estão envolvidos em funções de ligação não antigênicas e têm várias funções efetoras mediadas pela ligação de moléculas efetoras, por exemplo, ligação do FcRn. Como ilustrado na Figura 1A, os domínios Fc são compreendidos de um domínio CH₂ e um domínio CH₃. A maioria dos resíduos envolvidos na interação com FcRn está localizada nas alças diretamente adjacentes à interface C_{H2}-C_{H3} (Figura 1A, linha pontilhada) e

em frente ao sítio de glicosilação. A Figura 1B ilustra a representação da superfície da estrutura de cristal de IgG1 Fc (pdb: 5d4q) e mostra resíduos nos domínios CH2 e CH3 que compreendem a interface de ligação ao FcRn. A presente descrição fornece polipeptídeos de ligação compreendendo um domínio Fc modificado. Os polipeptídeos de ligação que compreendem um domínio Fc modificado podem ser anticorpos ou imunoadesinas ou proteínas de fusão Fc.

[00164] Em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode compreender um domínio Fc modificado compreendendo uma substituição de aminoácidos que altera as funções efetoras independentes do antígeno do anticorpo, em particular, a meia-vida circulante (por exemplo, meia-vida sérica) do polipeptídeo de ligação. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode compreender um domínio Fc modificado compreendendo uma substituição de aminoácidos que altera a meia-vida sérica do polipeptídeo de ligação, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem (isto é, não modificado). Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode compreender um domínio Fc modificado compreendendo uma substituição de aminoácidos que aumenta a meia-vida sérica do polipeptídeo de ligação, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem (isto é, não modificado). Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode compreender um domínio Fc modificado compreendendo uma substituição de aminoácidos que diminui a meia-vida sérica do polipeptídeo de ligação, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem (isto é, não modificado).

[00165] Em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc modificado que altera (isto é, aumenta ou diminui) a meia-vida circulante (por exemplo, a meia-vida sérica) con-

têm ainda uma ou mais mutações além da(s) mutação(ões) que altera(m) a meia-vida circulante. Em certas modalidades, as uma ou mais mutações, além da(s) mutação(ões) que alteram a meia-vida circulante, fornecem uma ou mais características bioquímicas desejadas, como, por exemplo, uma ou mais funções efetoras reduzidas ou realçadas, a capacidade de não dimerizar covalentemente, capacidade aumentada de localizar-se no sítio de um tumor, meia-vida sérica reduzida, meia-vida sérica aumentada quando comparadas com um anticorpo inteiro inalterado com aproximadamente a mesma imunogenicidade e similares.

[00166] Os polipeptídeos de ligação aqui descritos podem exibir ligação aumentada ou diminuída ao receptor Fc neonatal (FcRn) quando comparados aos polipeptídeos de ligação que não possuem essas substituições e, portanto, têm uma meia-vida sérica aumentada ou diminuída, respectivamente. Espera-se que os domínios Fc com afinidade melhorada para FcRn tenham meias-vidas séricas mais longas, e essas moléculas têm aplicações úteis em métodos de tratamento de mamíferos onde a meia-vida longa do anticorpo administrado é desejada, por exemplo, para tratar uma doença ou distúrbio crônico. Por outro lado, espera-se que os domínios Fc com afinidade de ligação ao FcRn diminuída tenham meias-vidas séricas mais curtas e essas moléculas também sejam úteis, por exemplo, para administração a um mamífero onde um tempo de circulação reduzido possa ser vantajoso, por exemplo, para imageamento diagnóstico *in vivo* ou em situações onde o anticorpo inicial tenha efeitos colaterais tóxicos quando presente na circulação por períodos prolongados. Os domínios Fc com afinidade de ligação ao FcRn diminuída também têm menor probabilidade de cruzar a placenta e, portanto, também são úteis no tratamento de doenças ou distúrbios em mulheres grávidas. Além disso, outras apli-

cações nas quais uma afinidade de ligação ao FcRn reduzida pode ser desejada incluem aplicações localizadas no cérebro, rim e/ou fígado.

[00167] Deve ser entendido que os métodos descritos nesta descrição não estão limitados a métodos particulares e condições experimentais aqui descritas, pois esses métodos e condições podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui tem o objetivo de descrever apenas modalidades particulares, e não se destina a ser limitativa.

[00168] Além disso, as experiências aqui descritas, a menos que de outra maneira indicada, utilizam técnicas biológicas e imunológicas moleculares e celulares convencionais dentro da experiência da técnica. Tais técnicas são bem conhecidas do trabalhador qualificado e são explicadas completamente na literatura. Veja, por exemplo, Ausubel, et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2008), incluindo todos os suplementos, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Quarta Edição) por MR Green e J. Sambrook e Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2ª edição).

[00169] A menos que definido de outra forma, os termos científicos e técnicos aqui utilizados têm os significados que são comumente entendidos pelos versados na técnica. No caso de qualquer ambiguidade latente, as definições aqui fornecidas têm precedência sobre qualquer dicionário ou definição extrínseca. A menos que de outra maneira requerido pelo contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e os termos plurais devem incluir o singular. O uso de "ou" significa "e/ou", a menos que de outra maneira indicada. O uso do termo "incluindo", bem como de outras formas, como "inclui" e "incluído", não é limitativo.

[00170] Geralmente, a nomenclatura usada em conexão com a cultura de células e tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química e hibridização de proteínas e ácidos nucleicos aqui descritas é bem conhecida e comumente usada na técnica. Os métodos e técnicas aqui fornecidos são geralmente realizados de acordo com os métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo da presente especificação, a menos que indicado de outra forma. As reações enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante, como geralmente realizado na técnica ou como descrito aqui. As nomenclaturas usadas em conexão com e os procedimentos e técnicas de laboratório de química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e liberação e tratamento de pacientes.

[00171] Para que a descrição possa ser mais facilmente compreendida, os termos selecionados são definidos abaixo.

[00172] O termo "polipeptídeo" refere-se a qualquer cadeia polimérica de aminoácidos e abrange proteínas nativas ou artificiais, análogos de polipeptídeos ou variantes de uma sequência de proteínas ou seus fragmentos, a menos que de outra maneira contradita pelo contexto. Um polipeptídeo pode ser monomérico ou polimérico. Um fragmento de polipeptídeo compreende pelo menos cerca de 5 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 10 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 15 aminoácidos contíguos ou pelo menos cerca de 20 aminoácidos contíguos, por exemplo.

[00173] O termo "proteína isolada" ou "polipeptídeo isolado" refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que, em virtude de sua origem ou

fonte de derivação, não está associado a componentes naturalmente associados que o acompanham em seu estado nativo; está substancialmente livre de outras proteínas da mesma espécie; é expresso por uma célula de uma espécie diferente; ou não ocorre na natureza. Assim, uma proteína ou polipeptídeo quimicamente sintetizado ou sintetizado em um sistema celular diferente da célula da qual se origina naturalmente será "isolado" de seus componentes naturalmente associados. Uma proteína ou polipeptídeo também pode ser tornado substancialmente livre de componentes naturalmente associados por isolamento utilizando técnicas de purificação de proteínas bem conhecidas na técnica.

[00174] Quando aqui usado, o termo "proteína de ligação" ou "polipeptídeo de ligação" deve se referir a uma proteína ou polipeptídeo (por exemplo, um anticorpo ou imunoadesina) que contém pelo menos um sítio de ligação que é responsável pela ligação seletiva a um antígeno alvo de interesse (por exemplo, um antígeno alvo humano). Sítios de ligação exemplares incluem um domínio variável de anticorpo, um sítio de ligação ao ligante de um receptor ou um sítio de ligação ao receptor de um ligante. Em certos aspectos, as proteínas de ligação ou polipeptídeos de ligação compreendem vários sítios de ligação (por exemplo, dois, três, quatro ou mais). Em certos aspectos, a proteína de ligação ou polipeptídeo de ligação não é uma enzima terapêutica.

[00175] O termo "ligante" refere-se a qualquer substância capaz de se ligar ou de se ligar a outra substância. Da mesma forma, o termo "antígeno" refere-se a qualquer substância à qual um anticorpo possa ser gerado. Embora "antígeno" seja comumente usado em referência a um substrato de ligação ao anticorpo, e "ligante" seja frequentemente usado quando se refere a substratos de ligação a receptores, esses termos não diferenciam um do outro e abrangem uma ampla faixa de entidades químicas sobrepostas. Para evitar dúvidas, antígeno e ligan-

te são usados alternadamente em todo o documento. Os antígenos/ligantes podem ser um peptídeo, um polipeptídeo, uma proteína, um aptâmero, um polissacarídeo, uma molécula de açúcar, um carboidrato, um lipídio, um oligonucleotídeo, um polinucleotídeo, uma molécula sintética, uma molécula inorgânica, uma molécula orgânica e qualquer combinação dos mesmos.

[00176] O termo "liga-se especificamente", quando aqui usado, refere-se à capacidade de um anticorpo ou uma imunoadesina ligar-se a um antígeno com uma constante de dissociação (Kd) de no máximo cerca de 1×10^{-6} M, cerca de 1×10^{-7} M, cerca de 1×10^{-8} M, cerca de 1×10^{-9} M, cerca de 1×10^{-10} M, cerca de 1×10^{-11} M, cerca de 1×10^{-12} M ou menos e/ou para se ligar a um antígeno com uma afinidade que é pelo menos cerca de duas vezes maior que a sua afinidade por um antígeno não específico.

[00177] Quando aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a tais montagens (por exemplo, moléculas de anticorpo intactas, imunoadesinas ou variantes dos mesmos) que têm atividade imunorreativa específica conhecida significativa a um antígeno de interesse (por exemplo, um antígeno associado a um tumor). Os anticorpos e imunoglobulinas compreendem cadeias leves e pesadas, com ou sem uma ligação covalente entre cadeias. As estruturas de imunoglobulina básicas nos sistemas vertebrados são relativamente bem compreendidas.

[00178] Como será discutido em mais detalhes abaixo, o termo genérico "anticorpo" compreende cinco classes distintas de anticorpo que podem ser distinguidas bioquimicamente. Embora todas as cinco classes de anticorpos estejam claramente dentro do escopo da presente descrição, a discussão a seguir será geralmente direcionada à classe IgG de moléculas de imunoglobulina. No que diz respeito à IgG, as imunoglobulinas compreendem duas cadeias leves idênticas de peso molecular, aproximadamente 23.000 Daltons, e duas cadeias pesadas

idênticas de peso molecular 53.000-70.000. As quatro cadeias são unidas por ligações dissulfeto em uma configuração "Y" em que as cadeias leves suportam as cadeias pesadas começando na boca do "Y" e continuando através da região variável.

[00179] As cadeias leves de imunoglobulina são classificadas como capa (κ) ou lambda (λ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada a uma cadeia leve capa ou lambda. Em geral, as cadeias leve e pesada são covalentemente ligadas entre si e as porções da "cauda" das duas cadeias pesadas são ligadas entre si por ligações dissulfeto covalentes ou ligações não covalentes quando as imunoglobulinas são geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente modificadas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos vão de um terminal N nas extremidades bifurcadas da configuração Y ao terminal C na base de cada cadeia. Aqueles versados na técnica apreciarão que as cadeias pesadas são classificadas como gama (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) ou epsilon (ϵ), com algumas subclasses entre elas (por exemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). É a natureza dessa cadeia que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgG ou IgE, respectivamente. As subclasses de isótipo de imunoglobulina (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) são bem caracterizadas e são conhecidas por conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma dessas classes e isotipos são facilmente discerníveis para os versados na técnica em vista da presente descrição e, portanto, estão dentro do escopo da presente descrição.

[00180] Ambas cadeias leve e pesada são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. O termo "região" refere-se a uma parte ou porção de uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo e inclui região constante ou regiões variáveis, bem como partes ou porções mais discretas das referidas regiões. Por exemplo, regiões variáveis de cadeia leve incluem "regiões determinantes de complementaridade"

ou "CDRs" intercaladas entre "regiões de estrutura" ou "FRs", conforme aqui definido.

[00181] As regiões de uma cadeia pesada ou leve de imunoglobulina podem ser definidas como regiões "constante" (C) ou "variável" (V), com base em uma falta relativa de variação de sequência dentro de regiões de vários membros da classe no caso de uma "região constante" ou com base em uma variação significativa dentro das regiões de vários membros da classe no caso de uma "região variável". Os termos "região constante" e "região variável" também podem ser utilizados funcionalmente. A este respeito, será apreciado que as regiões variáveis de uma imunoglobulina ou anticorpo determinam o reconhecimento e a especificidade do antígeno. Inversamente, as regiões constantes de uma imunoglobulina ou anticorpo conferem funções efetoras importantes, como secreção, mobilidade transplacentária, ligação ao receptor Fc, ligação ao complemento e similares. As estruturas das subunidades e configurações tridimensionais das regiões constantes das várias classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[00182] As regiões constantes e variáveis das cadeias pesada e leve de imunoglobulina são dobradas em domínios. O termo "domínio" refere-se a uma região globular de uma cadeia pesada ou leve compreendendo alças peptídicas (por exemplo, compreendendo 3 a 4 alças peptídicas) estabilizadas, por exemplo, por folha β -dobrada e/ou uma ligação dissulfeto intracadeia. Os domínios da região constante na cadeia leve de uma imunoglobulina são referidos alternadamente como "domínios da região constante de cadeia leve", "regiões CL" ou "domínios CL". Domínios constantes na cadeia pesada (por exemplo, domínios de articulação, CH1, CH2 ou CH3) são referidos alternadamente como "domínios da região constante de cadeia pesada", "domínios da região CH" ou "domínios CH". Os domínios variáveis na cadeia leve são referidos alternadamente como "domínios da região variável

de cadeia leve", "domínios da região VL" ou "domínios VL". Os domínios variáveis na cadeia pesada são referidos alternadamente como "domínios da região variável de cadeia pesada", "domínios da região VH" ou "domínios VH".

[00183] Por convenção, a numeração dos aminoácidos dos domínios da região constante variável aumenta à medida que se tornam mais distais do sítio de ligação ao antígeno ou do terminal amino da imunoglobulina ou anticorpo. O terminal N de cada cadeia pesada e leve de imunoglobulina é uma região variável e o terminal C é uma região constante. Os domínios CH3 e CL compreendem o terminal carboxi de cadeia pesada e leve, respectivamente. Por conseguinte, os domínios de uma imunoglobulina de cadeia leve estão dispostos em uma orientação VL-CL, enquanto os domínios de cadeia pesada estão dispostos na orientação VH-CH1-articulação-CH2-CH3.

[00184] A atribuição de aminoácidos a cada domínio de região variável está de acordo com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991). Kabat também fornece uma convenção de numeração amplamente usada (numeração do Kabat) na qual os resíduos correspondentes entre diferentes regiões variáveis da cadeia pesada ou entre diferentes regiões variáveis da cadeia leve recebem o mesmo número. CDRs 1, 2 e 3 de um domínio VL também são aqui referidos, respectivamente, como CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3. CDRs 1, 2 e 3 de um domínio VH também são aqui referidos, respectivamente, como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3. Se indicado, a atribuição de CDRs pode estar de acordo com o IMGT® (Lefranc et al., *Developmental & Comparative Immunology* 27: 55-77; 2003) em vez de Kabat. A numeração da região constante de cadeia pesada é feita através do índice de EU, conforme mencionado em Kabat (Kabat, Se-

quences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991).

[00185] Quando aqui usado, o termo "domínio VH" inclui o domínio variável de terminal amino de uma cadeia pesada de imunoglobulina e o termo "domínio VL" inclui o domínio variável de terminal amino de uma cadeia leve da imunoglobulina.

[00186] Quando aqui usado, o termo "domínio CH1" inclui o primeiro domínio da região constante (mais terminal amino) de uma cadeia pesada de imunoglobulina que se estende, por exemplo, a partir de cerca das posições 114-223 no sistema de numeração de Kabat (posições de EU 118-215). O domínio CH1 é adjacente ao domínio VH e ao terminal amino da região de articulação de uma molécula de cadeia pesada de imunoglobulina e não forma uma parte da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina.

[00187] Quando aqui usado, o termo "região de articulação" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que une o domínio CH1 ao domínio CH2. A região de articulação compreende aproximadamente 25 resíduos e é flexível, permitindo assim que as duas regiões de ligação ao antígeno de terminal N se movam independentemente. As regiões de articulação podem ser subdivididas em três domínios distintos: domínios de articulação superior, médio e inferior (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161: 4083).

[00188] Quando aqui usado, o termo "domínio CH2" inclui a porção de uma molécula de imunoglobulina de cadeia pesada que se estende, por exemplo, a partir das posições 244-360 no sistema de numeração Kabat (posições da EU 231-340). O domínio CH2 é único, pois não está emparelhado estreitamente com outro domínio. Em vez disso, duas cadeias de carboidratos ramificadas ligadas a N são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG nativa intacta. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descri-

ção compreende um domínio CH2 derivado de uma molécula de IgG1 (por exemplo, uma molécula de IgG1 humana).

[00189] Quando aqui usado, o termo "domínio CH3" inclui a porção de uma molécula de imunoglobulina de cadeia pesada que se estende aproximadamente 110 resíduos do terminal N do domínio CH2, por exemplo, a partir das posições 361-476 do sistema de numeração Kabat (posições de EU 341 -445). O domínio CH3 forma tipicamente a porção de terminal C do anticorpo. Em algumas imunoglobulinas, no entanto, domínios adicionais podem se estender do domínio CH3 para formar a porção de terminal C da molécula (por exemplo, o domínio CH4 na cadeia μ de IgM e na cadeia ϵ de IgE). Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreende um domínio CH3 derivado de uma molécula de IgG1 (por exemplo, uma molécula de IgG1 humana).

[00190] Quando aqui usado, o termo "domínio CL" inclui o domínio da região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina que se estende, por exemplo, da posição 107A de Kabat à posição 216A de Kabat. O domínio CL é adjacente ao domínio VL. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreende um domínio CL derivado de uma cadeia leve capa (por exemplo, uma cadeia leve capa humana).

[00191] Quando aqui usado, o termo "região Fc" é definido como a porção de uma região constante de cadeia pesada começando na região de articulação logo a montante do sítio de clivagem da papaína (isto é, resíduo 216 em IgG, levando o primeiro resíduo da região constante de cadeia pesada a ser 114) e terminando no terminal C do anticorpo. Por conseguinte, uma região Fc completa compreende pelo menos um domínio de articulação, um domínio CH2 e um domínio CH3.

[00192] O termo "Fc nativo" ou "Fc tipo selvagem", quando aqui usado, refere-se a uma molécula que compreende a sequência de um fragmento que não ligação ao antígeno resultante da digestão de um anticorpo ou produzido por outros meios, seja em forma monomérica ou multimérica e pode conter a região da articulação. A fonte de imunoglobulina original do Fc nativo é tipicamente de origem humana e pode ser qualquer uma das imunoglobulinas, como IgG1 e IgG2. As moléculas de Fc nativas são compostas de polipeptídeos monoméricos que podem ser ligados em formas diméricas ou multiméricas por associação covalente (isto é, ligações dissulfeto) e não covalente. O número de ligações dissulfeto intermoleculares entre as subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varia de 1 a 4, dependendo da classe (por exemplo, IgG, IgA e IgE) ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgGA2). Um exemplo de um Fc nativo é um dímero ligado a dissulfeto resultante da digestão com papaína de uma IgG. O termo "Fc nativo", quando aqui usado, é genérico para as formas monoméricas, diméricas e multiméricas.

[00193] O termo "variante de Fc" ou "Fc modificado", quando aqui usado, refere-se a uma molécula ou sequência que é modificada a partir de um Fc nativo/tipo selvagem, mas ainda compreende um sítio de ligação para o FcRn. Assim, o termo "variante de Fc" pode compreender uma molécula ou sequência que é humanizada a partir de um Fc nativo não humano. Além disso, um Fc nativo compreende regiões que podem ser removidas porque fornecem características estruturais ou atividades biológicas que não são necessárias para os polipeptídeos de ligação semelhantes a anticorpo aqui descritos. Assim, o termo "variante de Fc" compreende uma molécula ou sequência que carece de um ou mais sítios ou resíduos de Fc nativos, ou na qual um ou mais sítios ou resíduos de Fc foram modificados, que afetam ou estão envolvidos em: (1) formação de ligação dissulfeto, (2) incompatibilida-

de com uma célula hospedeira selecionada, (3) heterogeneidade do terminal N mediante expressão em uma célula hospedeira selecionada, (4) glicosilação, (5) interação com complemento, (6) ligação a um receptor Fc que não seja um receptor de resgate, ou (7) citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[00194] Em certas modalidades exemplares, uma variante de Fc aqui apresentada tem uma ou mais de meia-vida sérica aumentada, afinidade de ligação ao FcRn realçada, afinidade de ligação ao FcRn realçada em pH ácido, afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada e/ou estabilidade térmica similar, em comparação com um anticorpo IgG compreendendo um Fc tipo selvagem.

[00195] O termo "domínio Fc", quando aqui usado, abrange variantes e sequências de Fc e de Fc nativo/tipo selvagem, conforme definido acima. Como com as variantes de Fc e moléculas de Fc nativas, o termo "domínio Fc" inclui moléculas na forma monomérica ou multimérica, se digeridas a partir de anticorpos inteiros ou produzidas por outros meios.

[00196] Como indicado acima, as regiões variáveis de um anticorpo permitem que ele reconheça seletivamente e se ligue especificamente a epítomos em antígenos. Ou seja, o domínio VL e o domínio VH de um anticorpo se combinam para formar a região variável (Fv) que define um sítio de ligação ao antígeno tridimensional. Esta estrutura de anticorpo quaternário forma o sítio de ligação ao antígeno presente no final de cada subdivisão do Y. Mais especificamente, o sítio de ligação ao antígeno é definido por três regiões de determinação da complementaridade (CDRs) em cada uma das regiões variáveis de cada cadeia pesada e leve. Quando aqui usado, o termo "sítio de ligação ao antígeno" inclui um sítio que se liga especificamente a (imunorreage com) um antígeno (por exemplo, uma superfície celular ou antígeno solúvel). O sítio de ligação ao antígeno inclui uma região variável de cadeia pe-

sada e de cadeia leve da imunoglobulina e o sítio de ligação formado por essas regiões variáveis determina a especificidade do anticorpo. Um sítio de ligação ao antígeno é formado por regiões variáveis que variam de um anticorpo para outro. Os anticorpos alterados da presente descrição compreendem pelo menos um sítio de ligação ao antígeno.

[00197] Em certas modalidades, os polipeptídeos de ligação da presente descrição compreendem pelo menos dois domínios de ligação ao antígeno que fornecem a associação do polipeptídeo de ligação ao antígeno selecionado. Os domínios de ligação ao antígeno não precisam ser derivados da mesma molécula de imunoglobulina. A este respeito, a região variável pode ou ser derivada de qualquer tipo de animal que possa ser induzido a montar uma resposta humoral e gerar imunoglobulinas contra o antígeno desejado. Como tal, a região variável de um polipeptídeo de ligação pode ser, por exemplo, de origem mamífera, por exemplo, pode ser humano, murino, rato, cabra, ovelha, primata não humano (como macacos cinomolgos, macacos, etc.), trevoço ou camélideo (por exemplo, de camelos, lhamas e espécies relacionadas).

[00198] Em anticorpos de ocorrência natural, as seis CDRs presentes em cada anticorpo monomérico são sequências curtas, não contíguas de aminoácidos que são posicionadas especificamente para formar o sítio de ligação ao antígeno, pois o anticorpo assume sua configuração tridimensional em um ambiente aquoso. O restante dos domínios variáveis pesados e leves mostra menor variabilidade intermolecular na sequência de aminoácidos e são denominadas regiões de estrutura. As regiões de estrutura adotam amplamente uma conformação da folha β e as CDRs formam alças que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura da folha β . Assim, essas regiões de estrutura atuam para formar uma estrutura que fornece o posicionamento das

seis CDRs na orientação correta por interações não covalentes, de intercadeias. O domínio de ligação ao antígeno formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar ao epítipo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente do anticorpo ao epítipo do antígeno imunorreativo.

[00199] Polipeptídeos de ligação exemplares incluem variantes de anticorpos. Quando aqui usado, o termo "variante de anticorpo" inclui formas sintéticas e modificadas de anticorpos que são alteradas para que não sejam de ocorrência natural, por exemplo, anticorpos que compreendem pelo menos duas porções da cadeia pesada, porém, não duas cadeias pesadas completas (tais como, anticorpos ou minicorpos deletados por domínio); formas multiespecíficas de anticorpos (por exemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para se ligarem a dois ou mais antígenos diferentes ou a epítipos diferentes em um único antígeno); moléculas de cadeia pesada unidas a moléculas de scFv e similares. Além disso, o termo "variante de anticorpo" inclui formas multivalentes de anticorpos (por exemplo, trivalente, tetravalente, etc., anticorpos que se ligam a três, quatro ou mais cópias do mesmo antígeno).

[00200] Quando aqui usado, o termo "valência" refere-se ao número de sítios de ligação ao alvo potenciais em um polipeptídeo. Cada sítio de ligação ao alvo se liga especificamente a uma molécula alvo ou sítio específico em uma molécula alvo. Quando um polipeptídeo compreende mais de um sítio de ligação ao alvo, cada sítio de ligação ao alvo pode se ligar especificamente à mesma molécula ou a diferentes moléculas (por exemplo, pode se ligar a diferentes ligantes ou diferentes antígenos ou epítipos diferentes no mesmo antígeno). Os polipeptídeos de ligação objeto tipicamente têm pelo menos um sítio de ligação específico para uma molécula de antígeno humana.

[00201] O termo "especificidade" refere-se à capacidade de se ligar especificamente (por exemplo, imunorreatir com) um determinado antígeno alvo (por exemplo, um antígeno alvo humano). Um polipeptídeo de ligação pode ser monoespecífico e conter um ou mais sítios de ligação que se ligam especificamente a um alvo ou um polipeptídeo pode ser multiespecífico e conter dois ou mais sítios de ligação que se ligam especificamente ao mesmo ou a diferentes alvos. Em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação é específico para duas porções diferentes (por exemplo, não sobrepostas) do mesmo alvo. Em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação é específico para mais de um alvo. Polipeptídeos de ligação exemplares (por exemplo, anticorpos) que compreendem sítios de ligação ao antígeno que se ligam a antígenos expressos em células tumorais são conhecidos na técnica e uma ou mais CDRs desses anticorpos podem ser incluídas em um anticorpo como aqui descrito.

[00202] O termo "antígeno" ou "antígeno alvo", quando aqui usado, refere-se a uma molécula ou uma porção de uma molécula que é capaz de ser ligada pelo sítio de ligação de um polipeptídeo de ligação. Um antígeno alvo pode ter um ou mais epítomos.

[00203] O termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de cerca de 20%, como dentro de cerca de 10%, dentro de cerca de 5% ou dentro de cerca de 1% ou menos de um determinado valor ou faixa.

[00204] Quando aqui usado, "administrar" ou "administração" refere-se ao ato de injetar ou de outra maneira liberar fisicamente uma substância como ela existe fora do corpo (por exemplo, um polipeptídeo de ligação isolado fornecido aqui) em um paciente, como por, porém, não limitado, liberação pulmonar (por exemplo, inalação), mucosal (por exemplo, intranasal), intradérmica, intravenosa, intramuscular e/ou qualquer outro método de liberação física aqui descrito ou conhe-

cido na técnica. Quando uma doença, ou um sintoma dela, está sendo gerenciado ou tratado, a administração da substância ocorre normalmente após o início da doença ou seus sintomas. Quando uma doença, ou sintoma dela, está sendo evitado, a administração da substância geralmente ocorre antes do início da doença ou seus sintomas e pode ser continuada cronicamente para adiar ou reduzir a aparência ou magnitude dos sintomas associados à doença.

[00205] Quando aqui usado, o termo "composição" destina-se a abranger um produto que contém os ingredientes especificados (por exemplo, um polipeptídeo de ligação isolado aqui fornecido) em, opcionalmente, as quantidades especificadas, bem como qualquer produto que resulte, direta ou indiretamente, da combinação dos ingredientes especificados, opcionalmente, nas quantidades especificadas.

[00206] "Quantidade eficaz" significa a quantidade de agente farmacêutico ativo (por exemplo, um polipeptídeo de ligação isolado da presente descrição) suficiente para efetuar um resultado fisiológico desejado em um indivíduo em necessidade do agente. A quantidade efetiva pode variar entre os indivíduos, dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonômico dos indivíduos a serem tratados, da formulação da composição, da avaliação da condição médica do indivíduo e de outros fatores relevantes.

[00207] Quando aqui usado, os termos "indivíduo" e "paciente" são usados alternadamente. Quando aqui usado, um indivíduo pode ser um mamífero, como um não primata (por exemplo, vacas, porcos, cavalos, gatos, cães, ratos, etc.) ou um primata (por exemplo, macaco e humano). Em certas modalidades, o termo "indivíduo", quando aqui usado, refere-se a um vertebrado, como um mamífero. Os mamíferos incluem, sem limitação, seres humanos, primatas não humanos, animais silvestres, animais selvagens, animais de fazenda, animais esportivos e animais de estimação.

[00208] Quando aqui usado, o termo "terapia" refere-se a qualquer protocolo, método e/ou agente que possa ser usado na prevenção, gerenciamento, tratamento e/ou melhoria de uma doença ou sintoma relacionado a ela. Em algumas modalidades, o termo "terapia" refere-se a qualquer protocolo, método e/ou agente que pode ser usado na modulação de uma resposta imune a uma infecção em um indivíduo ou um sintoma relacionado a ela. Em algumas modalidades, os termos "terapias" e "terapia" se referem a uma terapia biológica, terapia de suporte e/ou outras terapias úteis na prevenção, gerenciamento, tratamento e/ou melhoria de uma doença ou sintoma relacionado a ela, conhecido por alguém versado na técnica, como pessoal médico. Em outras modalidades, os termos "terapias" e "terapia" se referem a uma terapia biológica, terapia de suporte e/ou outras terapias úteis na modulação de uma resposta imune a uma infecção em um indivíduo ou um sintoma relacionado a ela conhecido por alguém versado na técnica como pessoal médico.

[00209] Quando aqui usado, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" referem-se à redução ou melhoria da progressão, gravidade e/ou duração de uma doença ou sintoma relacionado a ela, resultante da administração de uma ou mais terapias (incluindo, sem limitação, a administração de um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos, como um polipeptídeo de ligação isolado aqui fornecido). O termo "tratando", quando aqui usado, também pode se referir à alteração do curso da doença do indivíduo que está sendo tratado. Os efeitos terapêuticos do tratamento incluem, sem limitação, prevenção da ocorrência ou recorrência da doença, alívio de sintomas, diminuição das consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, diminuição da taxa de progressão da doença, melhoria ou palição do estado da doença e remissão ou prognóstico melhorado.

Polipeptídeos de Ligação

[00210] Em um aspecto, a presente descrição fornece polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos, imunoadesinas, variantes de anticorpos e proteínas de fusão) compreendendo um domínio Fc modificado. Os polipeptídeos de ligação aqui descritos abrangem qualquer polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc modificado. Em certas modalidades, o polipeptídeo de ligação é um anticorpo, ou imunoadesina ou seu derivado. Qualquer anticorpo de qualquer fonte ou espécie pode ser empregado nos polipeptídeos de ligação aqui descritos. Anticorpos adequados incluem, sem limitação, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos. Os anticorpos adequados incluem, sem limitação, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos de tamanho natural ou anticorpos de cadeia única.

[00211] Domínios Fc de qualquer classe de imunoglobulina (por exemplo, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) e espécies podem ser utilizados nos polipeptídeos de ligação aqui descritos. Domínios Fc quiméricos compreendendo porções de domínios Fc de diferentes espécies ou classes de Ig também podem ser empregados. Em certas modalidades, o domínio Fc é um domínio Fc humano. Em algumas modalidades, o domínio Fc é um domínio Fc de IgG1. Em outras modalidades, o domínio Fc é um domínio Fc de IgG4. Em algumas modalidades, o domínio Fc é um domínio Fc de IgG1 ou IgG4 humano. Em algumas modalidades, o domínio Fc é um domínio Fc de IgG1 humano. No caso de domínios Fc de outras espécies e/ou classes ou isótipos de Ig, o técnico versado apreciará que qualquer uma das substituições de aminoácidos aqui descritas pode ser adaptada de acordo. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos selecionado de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 ou Y436 e quaisquer combinações dos mesmos, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modali-

des, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla em quaisquer duas posições de aminoácidos selecionadas de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla em quaisquer três posições de aminoácidos selecionadas de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos quádrupla em quaisquer quatro posições de aminoácidos selecionadas de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos em qualquer uma das posições de aminoácidos selecionadas de M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432 ou Y436 e quaisquer combinações das mesmas, em que a posição N434 dos aminoácidos não é substituída (isto é, a posição de aminoácidos N434 é tipo selvagem), de acordo com a numeração de EU.

[00212] Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácido selecionado de M252Y (isto é, uma tirosina na posição do aminoácido 252), T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, N434F, N434P, N434Y, Y436H, Y436N ou Y436W e suas combinações, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla selecionada a partir de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; K288, em que a substituição é K288D ou K288N; T307, em que a substituição é T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q ou T307W;

E380, em que a substituição é E380C; N434, em que a substituição é N434F, N434P ou N434Y; Y436, em que a substituição é Y436H, Y436N ou Y436W, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla selecionada a partir de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; K288, em que a substituição é K288D ou K288N; T307, em que a substituição é T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q ou T307W; E380, em que a substituição é E380C; N434, em que a substituição é N434F, N434P ou N434Y; Y436, em que a substituição é Y436H, Y436N ou Y436W, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos quádrupla selecionada a partir de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; K288, em que a substituição é K288D ou K288N; T307, em que a substituição é T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q ou T307W; E380, em que a substituição é E380C; N434, em que a substituição é N434F, N434P ou N434Y; Y436, em que a substituição é Y436H, Y436N ou Y436W, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos em qualquer uma das posições de aminoácidos selecionadas de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N ou Y436W e quaisquer combinações dos mesmos, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída por uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos em qualquer uma das posições de aminoácidos selecionadas de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W,

E380C, Y436H, Y436N ou Y436W, e quaisquer combinações dos mesmos, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída por uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos em qualquer uma das posições de aminoácidos selecionadas de M252Y, T256D, T256E, K288D, K288N, T307A, T307E, T307F, T307M, T307Q, T307W, E380C, Y436H, Y436N ou Y436W, e quaisquer combinações dos mesmos, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída (isto é, a posição do aminoácido N434 é tipo selvagem), de acordo com a numeração de EU.

[00213] Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos selecionada de M252, T256, T307 ou N434, e quaisquer combinações dos mesmos, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla em quaisquer duas posições de aminoácidos selecionadas de M252, T256, T307 e N434, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla em quaisquer três posições de aminoácidos selecionadas de M252, T256, T307 e N434, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos quádrupla nas posições do aminoácido M252, T256, T307 e N434, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de M252, T256 ou T307, e quaisquer combinações da mesma, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída (isto é, a posição do aminoácido N434 é tipo selvagem), de acordo com a numeração de EU.

[00214] Em modalidades exemplares, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos selecionada de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; T307, em que a substituição é T307Q ou T307W; ou N434, em que a substituição é N434F ou N434Y e quaisquer combinações da mesma, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla em quaisquer duas posições de aminoácidos selecionadas de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; T307, em que a substituição é T307Q ou T307W; ou N434, em que a substituição é N434F ou N434Y, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla em quaisquer três posições de aminoácidos selecionadas de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; T307, em que a substituição é T307Q ou T307W; ou N434, em que a substituição é N434F ou N434Y, de acordo com a numeração de EU. Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos quádrupla nas posições de aminoácidos selecionadas de M252, em que a substituição é M252Y; T256, em que a substituição é T256D ou T256E; T307, em que a substituição é T307Q ou T307W; ou N434, em que a substituição é N434F ou N434Y, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de M252Y, T256D, T256E, T307Q ou T307W, e quaisquer combinações da mesma, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída por uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos

selecionada de M252Y, T256D, T256E, T307Q ou T307W, e quaisquer combinações da mesma, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída por uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de M252Y, T256D, T256E, T307Q ou T307W, e quaisquer combinações da mesma, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída (isto é, posição de aminoácido N434 é tipo selvagem), de acordo com a numeração de EU.

[00215] Em certas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos selecionada de T256D, ou T256E, e/ou T307W, ou T307Q, e compreende ainda uma substituição de aminoácidos selecionada de N434F, ou N434Y ou M252Y, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de T256D ou T256E e/ou T307W ou T307Q e compreenda ainda a substituição de aminoácidos M252Y, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída por uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de T256D, ou T256E, e/ou T307W, ou T307Q, e compreenda ainda a substituição de aminoácidos M252Y, em que a posição do aminoácido N434 não é substituído por uma tirosina (Y), de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda uma substituição de aminoácidos selecionada de T256D, ou T256E, e/ou T307W, ou T307Q, e compreenda ainda a substituição de aminoácidos M252Y, em que a posição do aminoácido N434 não é substituída (isto é, a posição do aminoácido N434 é tipo selvagem), de acordo com a numeração de EU.

[00216] Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla selecionada de M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, M252Y/N434F, M252Y/N434Y, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256D/N434F, T256D/N434Y, T256E/T307Q, T256E/T307W, T256E/N434F, T256E/N434Y, T307Q/N434F, T307Q/N434Y, T307W/N434F, e T307W/N434Y, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla selecionada de M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256D/N434F, M252Y/T256D/N434Y, M252Y/T256E/T307Q, M252Y/T256E/T307W, M252Y/T256E/N434F, M252Y/T256E/N434Y, M252Y/T307Q/N434F, M252Y/T307Q/N434Y, M252Y/T307W/N434F, M252T/T307W/N434Y, T256D/307Q/N434F, T256D/307W/N434F, T256D/307Q/N434Y, T256D/307W/N434Y, T256E/307Q/N434F, T256E/307W/N434F, T256E/307Q/N434Y, and T256E/307W/N434Y, de acordo com a numeração de EU.

[00217] Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos quádrupla selecionada a partir de M252Y/T256D/T307Q/N434F, M252Y/T256E/T307Q/N434F, M252Y/T256D/T307W/N434F, M252Y/T256E/T307W/N434F, M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307W/N434Y, e M252Y/T256E/T307W/N434Y, de acordo com a numeração de EU.

[00218] Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc modificado compreenda um aminoácido tipo selvagem na posição do aminoácido N434, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um domínio Fc não compreenda uma fenilalanina (F) ou tirosina (Y) na posição do aminoácido N434, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modali-

dades, pode ser desejável que um domínio Fc não compreenda uma tirosina (Y) na posição do aminoácido N434, de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos dupla selecionada entre M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q e T256E/T257E de acordo com a numeração de EU. Em algumas modalidades, o domínio Fc modificado pode compreender uma substituição de aminoácidos tripla selecionada de M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q e M252Y/T256E/T307W, de acordo com a numeração de EU.

[00219] Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação com ligação ao FcRn alterada compreende um domínio Fc tendo uma ou mais substituições de aminoácidos, como aqui descrito. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação com afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende um domínio Fc tendo uma ou mais substituições de aminoácidos, como aqui descrito. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação com afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende um domínio Fc tendo duas ou mais substituições de aminoácidos, como aqui descrito. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação com afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende um domínio Fc tendo três ou mais substituições de aminoácidos, como aqui descrito.

[00220] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode exibir uma afinidade de ligação ao FcRn específica da espécie. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação pode exibir afinidade de ligação ao FcRn humano. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação pode exibir afinidade de ligação ao FcRn de rato. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação pode exibir afinidade de ligação ao FcRn de espécies cruzadas. Diz-se que esses polipeptídeos de

ligação são reativos cruzados através de uma ou mais espécies diferentes. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação pode exibir afinidade de ligação ao FcRn igualmente de humano e de rato.

[00221] O receptor Fc neonatal (FcRn) interage com a região Fc dos anticorpos para promover a reciclagem através do resgate da degradação lisossômica normal. Este processo é um processo dependente de pH que ocorre nos endossomas com pH ácido (por exemplo, um pH menor que 6,5), porém, não sob as condições fisiológicas de pH da corrente sanguínea (por exemplo, um pH não ácido). Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreendendo um domínio Fc modificado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em pH menor que 7, por exemplo, a cerca do pH 6,5, a cerca do pH 6,0, a cerca do pH 6,0, a cerca do pH 5,5, a cerca do pH 5,0, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em pH menor que 7, por exemplo, a cerca do pH 6,5, a cerca do pH 6,0, a cerca do pH 5,5, a cerca do pH 5,5, a cerca do pH 5,0, em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado. Um pH não ácido elevado pode ser, por exemplo, pH superior a 7, cerca do pH 7, cerca do pH 7,4, cerca do pH 7,6, cerca do pH 7,8, cerca do pH 8,0, cerca do pH 8,0, cerca do pH 8,5, cerca do pH 9,0.

[00222] Em certas modalidades, pode ser desejado que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado exiba aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao FcRn em pH não

ácido que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, pode ser desejável que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado apresente menos afinidade de ligação ao FcRn em pH não ácido do que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos dupla M428L/N434S, de acordo com a numeração de EU. Por conseguinte, pode ser desejado que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado exiba perturbação mínima à ligação de FcRn dependente de pH.

[00223] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido, tem uma taxa de dissociação de FcRn reduzida (isto é, mais lenta) em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo em um pH não ácido elevado, tem uma taxa de dissociação de FcRn mais lenta no pH ácido em comparação com a taxa de dissociação de FcRn do polipeptídeo de ligação no pH não ácido elevado.

[00224] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado que exibe afinidade de ligação ao FcRn superior em pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem é fornecido. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado que exibe afinidade de ligação ao FcRn superior em pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem é

fornecido. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado que exibe afinidade de ligação ao FcRn superior em pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem e exibe afinidade de ligação ao FcRn superior em pH ácido comparado a um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem é fornecido. Por conseguinte, em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado que exibe perda de ligação ao FcRn dependente do pH é fornecido.

[00225] Certas modalidades incluem anticorpos que, além das mutações Fc aqui descritas que exibem afinidade de ligação ao FcRn alterada, compreendem pelo menos um aminoácido em um ou mais domínios da região constante e/ou pelo menos um aminoácido em um ou mais dos domínios de região variável que foram deletados ou de outra maneira alterados de modo a fornecer características bioquímicas desejadas, como, por exemplo, funções efectoras reduzidas ou realçadas, a capacidade de dimerizar não covalentemente, capacidade aumentada de localizar-se no sítio de um tumor, meia-vida sérica reduzida, meia-vida sérica aumentada quando comparada com um anticorpo inalterado, completo com aproximadamente a mesma imunogenicidade e similares.

[00226] Em certas outras modalidades, os polipeptídeos de ligação compreendem regiões constantes derivadas de diferentes isótipos de anticorpos (por exemplo, regiões constantes de dois ou mais de uma IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana). Em outras modalidades, os polipeptídeos de ligação compreendem uma articulação quimérica (isto é, uma articulação compreendendo porções de articulação derivadas de domínios de articulação de diferentes isótipos de anticorpos, por exemplo, um domínio de articulação superior de uma molécula de IgG4 e um domínio de articulação médio de IgG1).

[00227] Em certas modalidades, o domínio Fc pode ser mutado para aumentar ou diminuir a função efetora usando técnicas conhecidas na arte. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreendendo um domínio Fc modificado tem afinidade de ligação alterada para um receptor Fc. Existem vários tipos diferentes de receptores Fc, que são classificados com base no tipo de anticorpo que eles reconhecem. Por exemplo, os receptores Fc-gama (Fc γ R) se ligam aos anticorpos da classe IgG, os receptores Fc-alfa (Fc α R) se ligam aos anticorpos da classe IgA e os receptores Fc-epsilon (Fc ϵ R) se ligam aos anticorpos da classe IgE. Os Fc γ Rs pertencem a uma família que inclui vários membros, por exemplo, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado alterou a afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa, em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado reduziu a afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa, em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado aumentou a afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tem aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa, em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

[00228] Em outras modalidades, os polipeptídeos de ligação, para uso nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui descritos, têm uma região constante, por exemplo, uma região constante de cadeia pesada de IgG1, que é alterada para reduzir ou eliminar a glicosilação. Por

exemplo, polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos ou imunoadesinas) compreendendo um domínio Fc modificado podem ainda compreender uma substituição de aminoácidos que altera a glicosilação do anticorpo Fc. Por exemplo, o referido domínio Fc modificado pode ter glicosilação reduzida (por exemplo, glicosilação ligada a N ou O).

[00229] Substituições de aminoácidos exemplares que conferem glicosilação reduzida ou alterada são descritos na Publicação Internacional PCT No. WO05/018572, que está incorporada em sua totalidade por referência aqui. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de ligação são modificados para eliminar a glicosilação. Tais polipeptídeos de ligação podem ser referidos como polipeptídeos de ligação "agly" (por exemplo, anticorpos "agly"). Embora não esteja limitado pela teoria, acredita-se que os polipeptídeos de ligação "agly" possam ter um perfil de segurança e estabilidade melhorada *in vivo*. Os polipeptídeos Agly podem ser de qualquer isótipo ou subclasse dos mesmos, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Inúmeros métodos reconhecidos na técnica estão disponíveis para produzir anticorpos "agly" ou anticorpos com glicanos alterados. Por exemplo, células hospedeiras geneticamente modificadas (por exemplo, levedura modificada, por exemplo, células *Picchia* ou CHO) com vias de glicosilação modificadas (por exemplo, deleções de glicosiltransferase) podem ser usadas para produzir esses anticorpos.

[00230] Em certas modalidades, os polipeptídeos de ligação podem compreender uma região constante de anticorpo (por exemplo, uma região constante de IgG, por exemplo, uma região constante de IgG humana, por exemplo, uma região constante de IgG1 humana) que media uma ou mais funções efetoras. Por exemplo, ligação do complexo C1 a uma região constante de anticorpo pode ativar o sistema de complemento. A ativação do sistema complemento é importante na

opsonização e lise dos patógenos celulares. A ativação do sistema complemento da mesma forma estimula a resposta inflamatória e pode da mesma forma estar envolvida na hipersensibilidade autoimune. Além disso, os anticorpos se ligam aos receptores em várias células através do domínio Fc (os locais de ligação ao receptor Fc na região Fc do anticorpo se ligam aos receptores Fc (FcRs) em uma célula). Existem vários receptores Fc que são específicos para diferentes classes de anticorpos, incluindo IgG (receptores gama), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). A ligação do anticorpo aos receptores Fc nas superfícies celulares desencadeia uma série de respostas biológicas importantes e diversas, incluindo o envolvimento e a destruição de partículas revestidas com anticorpos, a depuração de complexos imunes, lise das células alvo revestidas por anticorpos pelas células exterminadoras (chamadas citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, ou ADCC), liberação de mediadores inflamatórios, transferência placentária e controle da produção de imunoglobulina. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos ou imunoadesinas) se ligam a um receptor Fc-gama. Em modalidades alternativas, os polipeptídeos de ligação podem compreender uma região constante que é desprovida de uma ou mais funções efetoras (por exemplo, atividade ADCC) e/ou é incapaz de se ligar ao receptor Fc γ .

[00231] Proteínas, incluindo anticorpos, com baixa estabilidade termodinâmica, têm uma propensão aumentada para dobrar e agregar e limitariam ou dificultariam a atividade, eficácia e potencial da proteína como terapêutica útil. Em certas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modi-

ficado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado com a subestação de aminoácidos tripla M252Y/S254T/T256E (YTE).

[00232] O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tais como localização do tumor, biodistribuição e meia-vida sérica, podem ser facilmente medidos e quantificados usando técnicas imunológicas conhecidas sem experimentação indevida.

[00233] Em certas modalidades, o polipeptídeo de ligação da presente descrição pode compreender um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo. O termo "fragmento de ligação ao antígeno" refere-se a um fragmento de polipeptídeo de uma imunoglobulina ou anticorpo que se liga ao antígeno ou compete com o anticorpo intacto (isto é, com o anticorpo intacto do qual eles foram derivados) pela ligação ao antígeno (isto é, ligação específica). Os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser produzidos por métodos recombinantes ou bioquímicos que são bem conhecidos na técnica. Fragmentos de ligação a antígeno exemplares incluem Fv, Fab, Fab' e (Fab')₂. Em modalidades exemplares, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreende um fragmento de ligação ao antígeno e um domínio Fc modificado.

[00234] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de ligação compreende uma sequência de região variável de cadeia única (ScFv). As sequências da região variável de cadeia única compreendem um único polipeptídeo com um ou mais locais de ligação ao antígeno, por exemplo, um domínio VL ligado por um ligante flexível a um domínio VH. As moléculas de ScFv podem ser construídas em uma orientação VH-ligante-VL ou VL-ligante-VH. A articulação flexível que liga os domínios VL e VH que compõem o sítio de ligação ao antígeno inclui de cerca de 10 a cerca de 50 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos de cone-

xão são conhecidos na técnica. Os polipeptídeos de ligação podem compreender pelo menos um scFv e/ou pelo menos uma região constante. Em uma modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descrição pode compreender pelo menos um scFv ligado ou fundido a um domínio Fc modificado.

[00235] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação da presente descrição é um anticorpo multivalente (por exemplo, tetravalente) que é produzido pela fusão de uma sequência de DNA que codifica um anticorpo com uma molécula de ScFv (por exemplo, uma molécula de ScFv alterada). Por exemplo, em uma modalidade, essas sequências são combinadas de modo que a molécula de ScFv (por exemplo, uma molécula de ScFv alterada) seja ligada em seu terminal N ou terminal C a um fragmento Fc de um anticorpo por meio de um ligante flexível (por exemplo, um ligante gly/ser). Em outra modalidade, um anticorpo tetravalente da descrição atual pode ser feito fundindo-se uma molécula de ScFv a um peptídeo de conexão, que é fundido a um domínio Fc modificado para construir uma molécula tetravalente de ScFv-Fab.

[00236] Em outra modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descrição é um minicorpo alterado. Um minicorpo alterado da descrição atual é uma molécula dimérica composta de duas cadeias polipeptídicas, cada uma compreendendo uma molécula ScFv que é fundida a um domínio Fc modificado por meio de um peptídeo de conexão. Os anticorpos podem ser produzidos construindo um componente ScFv e conectando componentes peptídicos usando métodos descritos na técnica (veja, por exemplo, patente US 5.837.821 ou WO 94 / 09817A1). Em outra modalidade, um minicorpo tetravalente pode ser construído. Os minicorpos tetravalentes podem ser construídos da mesma maneira que os minicorpos, exceto que duas moléculas de

ScFv são ligadas usando um ligante flexível. A construção scFv-scFv ligada é em seguida associada a um domínio Fc modificado.

[00237] Em outra modalidade, um polipeptídeo de ligação da presente descrição compreende um diacorpo. Os diacorpos são moléculas diméricas e tetravalentes, cada uma com um polipeptídeo similar às moléculas scFv, porém geralmente com um ligante de resíduos de aminoácidos curto (inferior a 10, por exemplo, cerca de 1 a 5) que conecta ambos os domínios variáveis, de modo que os domínios VL e VH na mesma cadeia polipeptídica não pode interagir. Em vez disso, os domínios VL e VH de uma cadeia polipeptídica interage com os domínios VH e VL (respectivamente) em uma segunda cadeia polipeptídica (veja, por exemplo, WO 02/02781). Os diacorpos da presente descrição compreendem uma molécula do tipo scFv fundida com um domínio Fc modificado.

[00238] Em outras modalidades, os polipeptídeos de ligação compreendem anticorpos multiespecíficos ou multivalentes compreendendo um ou mais domínio variável em série na mesma cadeia polipeptídica, por exemplo, polipeptídeos de domínio variável em tandem (TVD). Os polipeptídeos de TVD exemplificativos incluem a configuração "cabeça dupla" ou "Dual-Fv" descrita na Patente U.S. No. 5.989.830. Na configuração Dual-Fv, os domínios variáveis de dois anticorpos diferentes são expressos em uma orientação tandem em duas cadeias separadas (uma cadeia pesada e uma cadeia leve), em que uma cadeia polipeptídica possui dois domínios VH em série separados por um ligante peptídico (VH1-ligante-VH2) e a outra cadeia polipeptídica consiste em domínios VL complementares conectados em série por um ligante peptídico (VL1-ligante-VL2). Na configuração de cabeça dupla cruzada, os domínios variáveis de dois anticorpos diferentes são expressos em uma orientação tandem em duas cadeias polipeptídicas separadas (uma cadeia pesada e uma cadeia leve), em

que uma cadeia polipeptídica possui dois domínios VH em série separados por um ligante peptídico (VH1-ligante-VH2) e a outra cadeia polipeptídica consiste em domínios VL complementares conectados em série por um ligante peptídico na orientação oposta (VL2-ligante-VL1). Variantes de anticorpo adicionais com base no formato "Dual-Fv" incluem o anticorpo biespecífico IgG de domínio variável Dual (DVD-IgG) (consulte Patente US No. 7.612.181 e o formato TBTI (consulte US 2010/0226923 A1). Em algumas modalidades, os polipeptídeos de ligação compreendem anticorpos multiespecíficos ou multivalentes compreendendo um ou mais domínio variável em série na mesma cadeia polipeptídica fundida com um domínio Fc modificado.

[00239] Em outra modalidade exemplar, o polipeptídeo de ligação compreende um anticorpo biespecífico de IgG de domínio variável duplo cruzado (CODV-IgG) com base em uma configuração de "cabeça dupla" (veja US20120251541 A1, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade).

[00240] Em outra modalidade exemplar, o polipeptídeo de ligação é uma imunoadesina. Quando aqui usado, uma "imunoadesina" refere-se a um polipeptídeo de ligação compreendendo um ou mais domínios de ligação (por exemplo, de um receptor, ligante ou molécula de adesão celular) ligados a um domínio constante de imunoglobulina (isto é, uma região Fc) (veja, Ashkenazi e outros, 1995, *Methods* 8 (2): 104-115, e Isaacs (1997) *Brit. J. Rheum.* 36: 305, que estão incorporados aqui por referência em sua totalidade). As imunoadesinas são identificadas pelo sufixo "-cepte" em seus nomes internacionais não proprietários (INN). Como anticorpos, as imunoadesinas têm meia-vida longa em circulação, são facilmente purificadas por métodos com base em afinidade e têm vantagens de avidéz conferidas pela bivalência. Exemplos de imunoadesinas terapêuticas disponíveis comercialmente incluem um receptor (ENBREL®), abatacepte (ORENCIA®), rilonacep-

te (ARCALYST®), aflibercepte (ZALTRAP® / EYLEA®) e belatacepte (NULOJIX®).

[00241] Em certas modalidades, o polipeptídeo de ligação compreende domínios do tipo imunoglobulina. Os domínios do tipo imunoglobulina adequados incluem, sem limitação, domínios da fibronectina (veja, por exemplo, Koide e outros (2007), *Methods Mol. Biol.*352: 95–109, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), DARPin (veja, por exemplo, Stumpp e outros (2008) *Drug Discov. Today*13 (15–16): 695–701, que está incorporado aqui por referência na sua totalidade), domínios Z da proteína A (veja, Nygren e outros (2008) *FEBS J.*275 (11): 2668–76, incorporado aqui por referência em sua sua totalidade), Lipocalinas (veja, por exemplo, Skerra e outros (2008) *FEBS J.*275 (11): 2677–83, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), Affilins (veja, por exemplo, Ebersbach e outros (2007) *J. Mol. Biol.*372 (1): 172–85, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), Affitins (veja, por exemplo, Krehenbrink e outros (2008). *J. Mol. Biol.*383 (5): 1058–68, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), Avimers (veja, por exemplo, Silverman e outros (2005) *Nat. Biotechnol.*23 (12): 1556–61, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), Fynomers, (veja, por exemplo, Grabulovski e outros (2007) *J Biol Chem*282 (5): 3196–3204, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade), e peptídeos de domínio Kunitz (veja, por exemplo, Nixon e outros (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261–8, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade).

[00242] Para polipeptídeos de ligação e imunoadesinas da presente descrição, praticamente qualquer antígeno pode ser direcionado pelos polipeptídeos de ligação, incluindo, porém, não limitado a proteínas, subunidades, domínios, motivos e/ou epítomos de antígenos alvo, que

incluem ambos os fatores solúveis, tais como citocinas e fatores ligados à membrana e receptores de transmembrana.

[00243] Um polipeptídeo de ligação da presente descrição, compreendendo um domínio Fc modificado aqui descrito, pode incluir as sequências CDR ou as sequências de domínio variável de um anticorpo "origem" conhecido. Em algumas modalidades, o anticorpo origem e o anticorpo da descrição podem compartilhar sequências similares ou idênticas, exceto para modificações no domínio Fc, como aqui descrito.

Ácidos Nucleicos e Vetores de Expressão

[00244] Em um aspecto, a invenção fornece polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de ligação aqui descritos. Métodos de produção de um polipeptídeo de ligação compreendendo a expressão desses polinucleotídeo são da mesma forma fornecidos.

[00245] Os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de ligação descritos aqui são tipicamente inseridos em um vetor de expressão para introdução em células hospedeiras que podem ser usadas para produzir a quantidade desejada dos anticorpos reivindicados, ou imunoadesinas. Desta maneira, em certos aspectos, a invenção fornece vetores de expressão compreendendo polinucleotídeos aqui descritos e células hospedeiras compreendendo esses vetores e polinucleotídeos.

[00246] O termo "vetor" ou "vetor de expressão" é usado aqui para os propósitos da especificação e reivindicações, para significar vetores usados para introduzir e expressar um gene desejado em uma célula. Como é do conhecimento dos especialistas na técnica, tais vetores podem ser facilmente selecionados a partir do grupo consistindo em plasmídeos, fagos, vírus e retrovírus. Em geral, um vetor compreenderá um marcador de seleção, locais de restrição apropriados para facili-

tar a clonagem do gene desejado e a capacidade de entrar e/ou replicar em células eucarióticas ou procarióticas.

[00247] Numerosos sistemas de vetores de expressão podem ser empregados. Por exemplo, uma classe de vetor utiliza elementos de DNA derivados de vírus animais, tais como vírus do papiloma bovino, vírus do poliomá, adenovírus, vírus da vacínia, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus SV40. Outros envolvem o uso de sistemas policistrônicos com locais internos de ligação ao ribossomo. Desta maneira, as células que integraram o DNA em seus cromossomos podem ser selecionadas introduzindo-se um ou mais marcadores que permitem a seleção de células hospedeiras transfectadas. O marcador pode fornecer prototrofia em um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocidas (por exemplo, antibióticos) ou resistência a metais pesados, tal como cobre. O gene marcador selecionável pode ser diretamente ligado às sequências de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por co-transformação. Elementos adicionais podem da mesma forma ser necessários para a síntese ideal de mRNA. Esses elementos podem incluir sequências de sinais, sinais de emenda, bem como promotores de transcrição, realçadores e sinais de terminação. Em algumas modalidades, os genes da região variável clonada são inseridos em um vetor de expressão juntamente com os genes da região constante de cadeia pesada e leve (tais como genes humanos) sintetizados como discutido acima.

[00248] Em outras modalidades, um polipeptídeo de ligação como aqui descrito pode ser expresso usando construções policistrônicas. Em tais sistemas de expressão, múltiplos produtos gênicos de interesse, tais como cadeias pesadas e leves de anticorpos, podem ser produzidos a partir de uma única construção policistrônica. Estes sistemas vantajosamente utilizam um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) para fornecer níveis relativamente altos de polipeptídeos nas

células hospedeiras eucarióticas. Sequências de IRES compatíveis são descritas em Pat. U.S. No. 6.193.980, que está aqui incorporada por referência. Aqueles versados na técnica apreciarão que esses sistemas de expressão podem ser utilizados para produzir efetivamente toda a faixa de polipeptídeos descritos no presente pedido.

[00249] Mais geralmente, uma vez que um vetor ou sequência de DNA que codifica um polipeptídeo de ligação da presente descrição, foi preparado, o vetor de expressão pode ser introduzido em uma célula hospedeira apropriada. Ou seja, a célula hospedeira pode ser transformada. A introdução do plasmídeo na célula hospedeira pode ser realizada por várias técnicas bem conhecidas dos especialistas na técnica. Estes incluem, mas não são limitados a, transfecção (incluindo eletroforese e eletroporação), fusão de protoplastos, precipitação de fosfato de cálcio, fusão celular com DNA envolvido, microinjeção e infecção por vírus intacto. Veja, por exemplo, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors", Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez e Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA 1988). As células transformadas são cultivadas em condições apropriadas para a produção das cadeias leves e cadeias pesadas e testadas quanto à síntese de proteínas da cadeia pesada e/ou leve. Técnicas de ensaio exemplares incluem ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) ou análise de classificação de célula ativada por fluorescência (FACS), imuno-histoquímica e similar.

[00250] Quando aqui usado, o termo "transformação" deve ser usado em um sentido amplo para se referir à introdução de DNA em uma célula hospedeira receptora que altera o genótipo e conseqüentemente resulta em uma alteração na célula receptora.

[00251] Na mesma linhagem, "células hospedeiras" refere-se a células que foram transformadas com vetores construídos usando técnicas de DNA recombinante e codificando pelo menos um gene heteró-

logo. Nas descrições de processos para isolamento de polipeptídeos de hospedeiros recombinantes, os termos "célula" e "cultura de células" são usados alternadamente para denotar a fonte de anticorpo, a menos que seja claramente especificado de outra forma. Em outras palavras, recuperação do polipeptídeo das "células" pode significar células totais centrifugadas ou da cultura celular contendo igualmente as células do meio e as suspensas.

[00252] Em uma modalidade, a linhagem de célula hospedeira usada para expressão do polipeptídeo de ligação é de origem eucariótica ou procariótica. Em uma modalidade, a linhagem de célula hospedeira usada para expressão do polipeptídeo de ligação é de origem bacteriana. Em uma modalidade, a linhagem de célula hospedeira usada para expressão do polipeptídeo de ligação é de origem mamífera; os especialistas na técnica podem determinar linhagens de célula hospedeira específicas que são mais adequadas para o produto de gene desejado a ser expresso nela. Exemplos de linhagens de célula hospedeira incluem, entre outros, DG44 e DUXB11 (linhagens de Ovário de Hamster Chinês, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linhagem de rim de macaco), COS (um derivado de CVI com antígeno SV40 T), R1610 (fibroblasto de hamster chinês) BALBC/3T3 (fibroblasto de camundongo), HAK (linhagem de rim de hamster), SP2/O (mieloma de camundongo), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócito humano), 293 (rim humano). Em uma modalidade, a linhagem de célula fornece glicosilação alterada, por exemplo, afucosilação, do anticorpo expresso a partir dela (por exemplo, PER.C6.RTM. (Crucell) ou linhagens de célula de CHO de FUT8-nocaut (células POTELLIGENT™) (Biowa, Princeton, NJ)). Em uma modalidade, células NS0 podem ser utilizadas. As linhagens de célula hospedeira estão normalmente disponíveis em serviços comerciais, a American Tissue Culture Collection ou na literatura publicada.

[00253] A produção *in vitro* permite a ampliação para produzir grandes quantidades dos polipeptídeos de ligação desejados. As técnicas para o cultivo de célula de mamífero sob condições de cultura de tecidos são conhecidas na técnica e incluem cultura de suspensão homogênea, por exemplo, em um reator de transporte aéreo ou em um reator de agitador contínuo, ou cultura de célula imobilizada ou aprisionada, por exemplo, em fibras ocas, microcápsulas, em microesferas de agarose ou cartuchos de cerâmica. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipeptídeos podem ser purificadas pelos métodos usuais de cromatografia, por exemplo, filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia sobre DEAE-celulose e/ou cromatografia de afinidade (imuno-).

[00254] Um ou mais genes que codificam polipeptídeos de ligação podem da mesma forma ser expressos em células não mamíferas, tais como bactérias ou leveduras ou células vegetais. A este respeito, será apreciado que vários microrganismos unicelulares não mamíferos, tais como bactérias, podem da mesma forma ser transformados; isto é, aqueles capazes de crescer em culturas ou fermentação. As bactérias suscetíveis à transformação incluem membros das enterobacteriaceae, tais como cepas de *Escherichia coli* ou *Salmonella*; *Bacillaceae*, tais como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* e *Haemophilus influenzae*. Será ainda apreciado que, quando expressos em bactérias, os polipeptídeos podem se tornar parte de corpos de inclusão. Os polipeptídeos devem ser isolados, purificados e depois montados em moléculas funcionais.

[00255] Além dos procariontes, micróbios eucarióticos podem da mesma forma ser utilizados. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de Baker comum, é o mais comumente usado entre os microrganismos eucarióticos, embora várias outras cepas estejam geralmente disponíveis. Para expressão em *Saccharomyces*, o plasmídeo

YRp7, por exemplo, (Stinchcomb e outros, *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman e outros, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper e outros, *Gene*, 10: 157 (1980)) é geralmente usado. Este plasmídeo já contém o gene TRP1 que fornece um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo ATCC No. 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). A presença da lesão *trp1* como uma característica do genoma da célula hospedeira da levedura fornece um ambiente eficaz para detectar a transformação pelo crescimento na ausência de triptofano.

Métodos de tratamento

[00256] Em um aspecto, a invenção fornece métodos de tratamento ou diagnóstico de um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de ligação aqui descrito. Em certas modalidades, a presente descrição fornece kits e métodos para o diagnóstico e/ou tratamento de distúrbios, por exemplo, distúrbios neoplásicos em um indivíduo mamífero com necessidade de tal tratamento. Em certas modalidades exemplares, o indivíduo é um humano.

[00257] Os polipeptídeos de ligação da presente descrição são úteis em várias aplicações diferentes. Por exemplo, em uma modalidade, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são úteis para reduzir ou eliminar células portadoras de um epítipo reconhecido pelo domínio de ligação do polipeptídeo de ligação. Em outra modalidade, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são eficazes na redução da concentração ou na eliminação de antígeno solúvel na circulação. Em outra modalidade, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são eficazes como engajadores de células T. Em uma modalidade, os polipeptídeos de ligação podem reduzir o tamanho do tumor, inibir o crescimento do tumor e/ou prolongar o tempo de sobrevivência de animais portadores de tumor. Desta maneira, esta descrição da mesma forma se refere a

um método de tratamento de tumores em um humano ou outro animal, administrando a esse humano ou animal uma quantidade eficaz e não tóxica de anticorpo modificado.

[00258] Em uma modalidade, os polipeptídeos de ligação objeto são úteis para o tratamento de uma doença ou distúrbio. Por exemplo, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são úteis para o tratamento de um distúrbio relacionado ao anticorpo ou um distúrbio, condição ou doença responsiva ao anticorpo. Quando aqui utilizados, os termos "distúrbio relacionado a anticorpos" ou "distúrbio responsivo a anticorpos" ou "condição" ou "doença" se referem ou descrevem uma doença ou distúrbio que pode ser melhorada pela administração de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou polipeptídeo de ligação da presente descrição.

[00259] Em uma modalidade, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são úteis para o tratamento de câncer. Quando aqui utilizados, os termos "câncer" ou "cancerígeno" se referem ou descrevem a condição fisiológica que é tipicamente caracterizada por crescimento celular não regulamentado. Exemplos de câncer incluem, porém não são limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluindo lipossarcoma), tumores neuroendócrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem câncer de células escamosas (por exemplo, câncer epitelial de células escamosas), câncer de pulmão, incluindo câncer de células pequenas, câncer de células não pequenas, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou estomacal, incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino,

carcinoma de glândula salivar, câncer de rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, câncer testicular, câncer de esôfago, tumores do trato biliar, bem como câncer de cabeça e pescoço.

[00260] Em outra modalidade, os polipeptídeos de ligação do indivíduo são úteis para o tratamento de outros distúrbios, incluindo, sem limitação, doenças infecciosas, distúrbios autoimunes, distúrbios inflamatórios, doenças pulmonares, doenças neuronais ou neurodegenerativas, doenças hepáticas, doenças da coluna vertebral, doenças do útero, transtornos depressivos e afins. Exemplos não limitantes de doenças infecciosas incluem aquelas causadas por vírus RNA (por exemplo, ortomixovírus (por exemplo, influenza), paramixovírus (por exemplo, vírus respiratório sincicial, vírus parainfluenza, metapneumovírus), rabdovírus (por exemplo, vírus da raiva), coronavírus, alfavírus (por exemplo, Vírus Chikungunya) lentivírus (por exemplo, HIV) e similares) ou vírus de DNA. Exemplos de doenças infecciosas da mesma forma incluem, sem limitação, doenças infecciosas bacterianas causadas por, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* e outras doenças infecciosas, incluindo, por exemplo, as causadas por *Candida albicans*. Outras doenças infecciosas incluem, sem limitação, malária, SARS, febre amarela, borreliose de Lyme, leishmaniose, antraz e meningite. Distúrbios autoimunes exemplares incluem, porém não são limitados a psoríase, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren, rejeição de enxerto, doença de Grave, miastenia grave e lúpus (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico). Desta maneira, esta descrição refere-se a um método de tratamento de várias condições que se beneficiariam da utilização de um polipeptídeo de ligação do indivíduo com, por exemplo, meia-vida realçada.

[00261] Alguém versado na técnica seria capaz, por experimentação de rotina, determinar qual seria uma quantidade eficaz e não tóxica de polipeptídeo de ligação modificado para o propósito de tratar doenças malignas. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente ativa de um polipeptídeo de ligação da presente descrição pode variar de acordo com fatores como o estágio da doença (por exemplo, estágio I versus estágio IV), idade, sexo, complicações médicas (por exemplo, condições ou doenças imunossuprimidas) e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo modificado provocar uma resposta desejada no indivíduo. O regime de dosagem pode ser ajustado para fornecer a resposta terapêutica ideal. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

[00262] Em geral, as composições fornecidas na presente descrição podem ser usadas para tratar profilaticamente ou terapeuticamente qualquer neoplasia compreendendo um marcador antigênico que permita o direcionamento das células cancerígenas pelo anticorpo modificado.

Composições Farmacêuticas e Administração das Mesmas

[00263] Os métodos de preparação e administração de polipeptídeos de ligação da presente descrição a um indivíduo são bem conhecidos ou são facilmente determinados pelos especialistas na técnica. A rotina de administração dos polipeptídeos de ligação da presente descrição pode ser oral, parentérica, por inalação ou tópica. O termo parenteral quando aqui utilizado inclui administração intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal. Embora todas essas formas de administração sejam claramente contempladas como estando dentro do escopo da presente descrição, uma forma de administração seria uma solução para injeção, em particular para injeção ou gotejamento intravenoso ou intraarterial. Nor-

malmente, uma composição farmacêutica adequada para injeção pode compreender um tampão (por exemplo, tampão de acetato, fosfato ou citrato), um tensoativo (por exemplo, polissorbato), opcionalmente um agente estabilizador (por exemplo, albumina humana), etc. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de ligação podem ser liberados diretamente no sítio da população celular adversa, desse modo aumentando a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[00264] As preparações para administração parentérica incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como azeite e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Os transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meios tamponados. Nas composições e métodos da presente descrição, os transportadores farmacêuticamente aceitáveis incluem, porém não são limitados a 0,01-0,1 M, por exemplo, tampão de fosfato 0,05M ou solução salina a 0,8%. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer com lactato ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluidos e nutrientes, reabastecedores de eletrólitos, tais como aqueles com base em dextrose de Ringer e similares. Conservantes e outros aditivos podem da mesma forma estar presentes, tais como por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes e similares. Mais particularmente, as composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (onde solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões estéreis injetáveis. Nesses casos, a composição deve ser estéril e fluida na medida em que exista facilidade de seringa. Deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e

normalmente será preservado contra a ação contaminante de microorganismos, tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido, e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos.

[00265] A prevenção da ação de microrganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, agentes isotônicos serão incluídos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00266] Em qualquer caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando um composto ativo (por exemplo, um polipeptídeo de ligação modificado por si só ou em combinação com outros agentes ativos) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes aqui enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril, que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários dentre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, métodos exemplares de preparação incluem secagem a vácuo e liofilização, que produz um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução filtrada anteriormente esterilizada. As preparações para injetáveis são processadas, carregadas em reci-

pientes tais como ampolas, sacos, garrafas, seringas ou frascos e seladas sob condições assépticas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Além disso, as preparações podem ser empacotadas e vendidas na forma de um kit. Tais artigos de fabricação terão tipicamente rótulos ou bulas, indicando que as composições associadas são úteis para o tratamento de um indivíduo que sofre ou predispõe de transtornos autoimunes ou neoplásicos.

[00267] Doses eficazes das composições da presente descrição, para o tratamento das condições descritas acima, variam dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, local de destino, estado fisiológico do paciente, seja humano ou animal, outros medicamentos administrados e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Normalmente, o paciente é um humano, porém mamífero não humano, incluindo mamíferos transgênicos, pode da mesma forma ser tratado. As dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos de rotina conhecidos aos especialistas na técnica para otimizar segurança e eficácia.

[00268] Os polipeptídeos de ligação da presente descrição podem ser administrados em várias ocasiões. Os intervalos entre doses únicas podem ser semanais, mensais ou anuais. Os intervalos podem ser irregulares como indicado pela medição dos níveis sanguíneos de polipeptídeo ou antígeno de ligação modificado no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para atingir uma concentração de polipeptídeo de ligação modificada no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml. Alternativamente, os polipeptídeos de ligação podem ser administrados como uma formulação de liberação prolongada, caso em que uma administração menos frequente é requerida. Para anticorpos, dosagem e frequência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. Em geral,

os anticorpos humanizados apresentam a meia-vida mais longa, seguidos pelos anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos.

[00269] A dosagem e a frequência da administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, as composições que contêm os presentes anticorpos ou um coquetel dos mesmos são administradas a um paciente que ainda não está no estado de doença para aumentar a resistência do paciente. Essa quantidade é definida como uma "dose eficaz profilática". Neste uso, as quantidades precisas novamente dependem do estado de saúde do paciente e da imunidade geral, porém geralmente variam de cerca de 0,1 a cerca de 25 mg por dose, especialmente cerca de 0,5 a 2,5 mg por dose. Uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente pouco frequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta (por exemplo, de cerca de 1 a 400 mg/kg de anticorpo por dose, com doses de cerca de 5 a 25 mg sendo mais comumente usadas para radioimunoconjugados e doses mais altas para anticorpos modificados por fármacos de citotoxina) em intervalos relativamente curtos é algumas vezes requerido até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada, ou até que o paciente mostre melhora parcial ou completamente dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode receber um regime profilático.

[00270] Os polipeptídeos de ligação da presente descrição podem opcionalmente ser administrados em combinação com outros agentes que são eficazes no tratamento do distúrbio ou condição que necessita de tratamento (por exemplo, profilático ou terapêutico). As dosagens eficazes de tratamento único (isto é, quantidades terapeuticamente eficazes) de anticorpos modificados marcados com ⁹⁰Y da descrição atual variam entre cerca de 5 e cerca de 75 mCi, tal como entre cerca

de 10 e cerca de 40 mCi. As doses ablativas eficazes sem tratamento medular de anticorpos modificados com ^{131}I variam entre cerca de 5 e cerca de 70 mCi, ou entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi. As dosagens ablativas eficazes de tratamento único (isto é, podem requerer transplante de medula óssea autólogo) de anticorpos marcados com ^{131}I variam entre cerca de 30 e cerca de 600 mCi, tal como entre cerca de 50 e menos de cerca de 500 mCi. Em conjunto com um anticorpo quimérico, devido à meia-vida de circulação mais longa em relação aos anticorpos murinos, as doses ablativas eficazes sem medula de tratamento único de anticorpos quiméricos marcados com iodo-131 variam entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi, tal como menos do que cerca de 30 mCi. Os critérios de imagem para, por exemplo, o rótulo ^{111}In , são tipicamente inferiores a cerca de 5 mCi.

[00271] Embora os polipeptídeos de ligação possam ser administrados como descrito imediatamente acima, deve-se enfatizar que em outras modalidades um polipeptídeo de ligação pode ser administrado a pacientes saudáveis tal como terapia de primeira linha. Em tais modalidades, os polipeptídeos de ligação podem ser administrados a pacientes com reservas normais ou médias de medula vermelha e/ou a pacientes que não têm e não estão em tratamento. Quando aqui usado, a administração de anticorpos modificados ou imunoadesinas em conjunção ou combinação com uma terapia adjunta significa a administração ou aplicação sequencial, simultânea, coextensiva, concorrente, concomitante ou contemporânea da terapia e dos anticorpos descritos. Aqueles versados na técnica apreciarão que a administração ou aplicação dos vários componentes do regime terapêutico combinado pode ser programada para realçar a eficácia geral do tratamento.

[00272] Como previamente discutido, os polipeptídeos de ligação da presente descrição, imunoadesivos ou seus recombinantes, podem ser administrados em uma quantidade farmacologicamente eficaz para

o tratamento *in vivo* de distúrbios de mamíferos. A este respeito, será apreciado que os polipeptídeos de ligação descritos serão formulados para facilitar a administração e promover a estabilidade do agente ativo.

[00273] Uma composição farmacêutica de acordo com a presente descrição pode compreender um transportador estéril farmacêuticamente aceitável, não tóxico, tal como solução salina fisiológica, tampões não tóxicos, conservantes e similares. Para os propósitos do presente pedido, uma quantidade farmacêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação, imunoadesina ou recombinante do mesmo, conjugada ou não conjugada a um agente terapêutico, deve ser mantida para significar uma quantidade suficiente para alcançar a ligação eficaz a um antígeno e alcançar um benefício por exemplo, para melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio ou detectar uma substância ou uma célula. No caso de células tumorais, o polipeptídeo de ligação modificado pode interagir com antígenos imunorreativos selecionados em células neoplásicas ou imunorreativas e proporcionar um aumento na morte dessas células. Obviamente, as composições farmacêuticas da presente descrição podem ser administradas em doses únicas ou múltiplas para fornecer uma quantidade farmacêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação modificado.

[00274] De acordo com o escopo da presente descrição, os polipeptídeos de ligação da descrição podem ser administrados a um humano ou outro animal de acordo com os métodos de tratamento acima mencionados, em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico ou profilático. Os polipeptídeos de ligação da descrição podem ser administrados a esse ser humano ou outro animal em uma forma de dosagem convencional preparada combinando o anticorpo da descrição com um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável convencional, de acordo com técnicas conhecidas. Será reconhecido

por alguém versado na técnica que a forma e o caráter do transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável são ditados pela quantidade de ingrediente ativo com o qual ele deve ser combinado, a rotina de administração e outras variáveis bem conhecidas. Os especialistas na técnica apreciarão ainda que um coquetel compreendendo uma ou mais espécies de polipeptídeos de ligação descritos na presente descrição pode revelar-se particularmente eficaz.

[00275] Os teores dos artigos, patentes e pedidos de patentes e todos os outros documentos e informações disponíveis eletronicamente mencionados ou citados aqui são incorporados por referência na sua totalidade na mesma medida em que cada publicação individual foi específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência. Requerentes se reservam o direito de fisicamente incorporar a este pedido todo e qualquer material e informação de tais artigos, patentes, pedidos de patentes ou outros documentos físicos e eletrônicos.

[00276] Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência às modalidades específicas da mesma, deve ser entendido pelos especialistas na técnica que várias alterações podem ser feitas e os equivalentes podem ser substituídos sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da invenção. Será facilmente aparente para os especialistas na técnica que outras modificações e adaptações adequadas dos métodos descritos aqui podem ser feitas usando equivalentes adequados sem se afastar do escopo das modalidades descritas aqui. Além disso, muitas modificações podem ser feitas para adaptar uma situação específica, material, composição da matéria, processo, etapa ou etapas do processo, ao objetivo, espírito e escopo da presente invenção. Todas essas modificações devem estar dentro do escopo das reivindicações anexas. Tendo agora descrito certas modalidades em detalhes, as mesmas serão mais claramente entendidas por referência

aos exemplos a seguir, que são incluídos apenas para fins ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

EXEMPLOS

[00277] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitantes adicionais.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Reagentes Proteicos:

[00278] As seguintes proteínas foram expressas e isoladas: antígeno com um rótulo de 8xHistidina C-terminal; rFcRn (UniProt: P1359, subunidade p51: resíduos 23-298; UniProt: P07151, β 2-m: resíduos 21-119); FcRn de cinomolgo biotinizado (UniProt: Q8SPV9, subunidade p51: resíduos 24-297 com um rótulo de Avi C-terminal; UniProt: Q8SPW0, β 2-m: resíduos 21-119); hFcRn biotinizado (UniProt: P55899, subunidade p51: resíduos 24-297 com um rótulo Avi C-terminal; UniProt: P61769, β 2-m: resíduos 21-119); CD16a humano (UniProt: P08637, Fc γ R11a: resíduos 17-208 com rótulo HPC4 C-terminal e valina na posição 158 (V158)). As variantes de cadeia pesada H435A e H310A / H435Q foram obtidas a partir de meios condicionados HEK293. Variantes de mAb2 foram clonadas por Evitria e purificadas a partir de meios condicionados com suspensão de CHO K1 usando colunas de afinidade mAbSelect SuRe (GE Healthcare) e tampão trocado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 para experiências subsequentes.

Construção de Biblioteca de Saturação:

[00279] As cadeias pesadas e leves do anticorpo mAb1 WT IgG1 com sequências de DNA líder foram incorporadas nos plasmídeos de expressão de mamífero pBH6414 e pBH6368, respectivamente, usando os sítios das enzimas de restrição NcoI e HindIII. A biblioteca de saturação foi criada com o Kit Lightning Site Directed Mutagenesis (Agilent) e os iniciadores NNK (N = A / C/G/T, K = G/T) e WWC (W =

A/T) (IDT Technologies) para introduzir todos os aminoácidos possíveis nas seguintes posições: M252, I253, S254, T256, K288, T307, K322, E380, L432, N434 e Y436 (Numeração de EU). As sequências de DNA de cadeia pesada das três variantes de controle na cadeia principal mAb1, AAA (T307A / E380A / N434A), LS (M428L/N434S) e YTE (M252Y/S254T/T256E), foram construídas no vetor pBH6414 por LakePharma.

[00280] A biblioteca de saturação combinada foi obtida por mutagenese direcionada ao sítio de cadeia pesada mAb1 com o Kit Q5 Mutagenesis (NEBiolabs) e iniciadores T256D, T256E, T307Q, T307W, N434F e N434Y com os modelos WT e M252Y na reação de PCR. A incorporação da mutação na cadeia principal Ab3 foi realizada usando o kit Q5 Mutagenesis (NEBiolabs) com os iniciadores M252Y, T256D, T307Q e T307W. A criação de todas as variantes Fc foi confirmada por Sanger Sequencing (Genewiz, Inc.).

Expressão e Purificação de Anticorpos Recombinantes:

[00281] Para avaliação de meio condicionado, DNA contendo a cadeia pesada mutante e a cadeia leve tipo selvagem de mAb1 foram transfectados em 1 mL de células de mamífero Expi293 (Invitrogen) para expressão de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de dióxido de carbono e 80% de umidade com agitação a 900 rotações por minuto (RPM) em uma placa de 2 mL de 96 cavidades (Greiner Bio-One) e seladas com uma membrana aerada. O meio condicionado foi coletado cinco dias após a transfecção e armazenado a -80 °C até o uso. As variantes de chumbo nas cadeias principais de mAb1 e Ab3 foram expressas em uma escala de 30 mL em frascos de 125 mL com tampas ventiladas de 0,2 µm (Corning). Os frascos de cultura de 125 mL foram agitados em 125 RPM durante toda a duração da expressão. O meio condicionado foi coleta-

do cinco dias após a transfecção e filtrado através de filtros cônicos de 0,22 μm , 50 mL (Corning) e armazenado a 4°C até a purificação.

[00282] O isolamento de mAb1 e Ab3 foi realizado usando colunas mAbSelect SuRe HiTrap de 1 mL (GE Healthcare). Após uma etapa de lavagem de PBS pH 7,4 para dez volumes de coluna, os anticorpos foram eluídos com cinco volumes de coluna de ácido cítrico 0,1 M pH 3,0 (Sigma) e neutralizados com 0,5 mL de base tris 1 M pH 9,0 (Sigma). Os anticorpos eluídos foram trocados de tampão contra PBS pH 7,4 e concentrados para $>1 \text{ mg mL}^{-1}$ usando Concentradores de 30 kDa MWCO Amicon (Millipore) para estudos subsequentes. A concentração dos anticorpos purificados foi determinada a partir da sua absorvência UV em 280 nm (UV_{280}) com um coeficiente de extinção apropriado.

Análise e Rastreamento de Meio Condicionado Octet:

[00283] O rastreamento de meios condicionados contendo as variantes de mAb1 foi realizada em um Octet QK 384 com biossensores de Ni-NTA (PALL Life Sciences). O antígeno marcado com His foi capturado a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 300 segundos em PBS, albumina de soro bovino a 0,1% (BSA, Sigma) e Tween-20 (Sigma) a 0,01%, pH 7,4 (PBST-BSA 7,4), seguido por 20 segundos de lavagem com PBST-BSA pH 7,4. Os anticorpos foram capturados por 200 segundos em meio condicionado diluído 1:1 com PBST-BSA pH 7,4. Após as etapas de lavagem do tampão em tampão pH 6,0, cinéticas de ligação ao FcRn foram obtidas usando 200 nM de rFcRn para tempos de associação e dissociação de 150 e 200 segundos, respectivamente, em pH 6,0. Em todas as etapas durante o rastreamento Octet, a temperatura foi de 30°C com uma velocidade de agitação de 1000 rpm. Os perfis cinéticos de ligação de rFcRn foram corrigidos para o início da fase de associação do FcRn e modelados para um modelo de ligação de 1:1 usando o software de análise Octet 7.1.

Cinética de Ligação ao FcRn:

[00284] A cinética de ligação ao FcRn em pH 6,0 e pH 7,4 foi medida usando um instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando protocolos modificados com a imobilização direta de FcRn ou o kit biotin CAPture (GE Healthcare) (veja, por exemplo, Abdiche e outros, MAb (2015) 7: 331-343; Karlsson e outros, Anal. Biochem. (2016) 502: 53-63). Para a imobilização direta, FcRn biotinizado, em concentrações de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi imobilizado por 180 s a $10 \mu\text{L min}^{-1}$ em acetato de sódio a 10 mM pH 4,5 (GE Healthcare) a ~ 20 RU na superfície de um chip sensor C1 através da química de acoplamento de amina (GE Healthcare). Com o kit biotin CAPture, o reagente CAPture foi capturado na superfície do chip CAP para uma RU de ligação de >2.000 RU, seguido por $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FcRn nos canais apropriados por 24 s a $30 \mu\text{L min}^{-1}$ até uma RU de ligação final de ~ 2 RU. O tampão fluente para as experiências de cinéticas de ligação ao FcRn foi PBS com Tensoativo P-20 a 0,05% (PBS-P +, GE Healthcare) em pH 6,0 ou 7,4. Uma série de concentrações de uma diluição em série 4 vezes de anticorpo a 1000 nM foi realizada em quadruplicata para cada variante, incluindo um controle a 0 nM. As medições cinéticas foram obtidas para tempos de associação e dissociação de 180 e 300 s, respectivamente, a uma taxa de fluxo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Os chips sensores C1 e CAP foram regenerados com tetraborato de sódio 10 mM, NaCl 1 M pH 8,5 (GE Healthcare) por 30 s a $50 \mu\text{L min}^{-1}$ ou cloridrato de guanidina 6 M, hidróxido de sódio 250 mM (GE Healthcare) por 120 s em $50 \mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente, seguido por uma etapa de estabilização adicional de 60 a 90 s em PBS-P+ pH 6.0. As medidas de RU em estado estacionário em pH 7,4 foram obtidas para todas as variantes a 1000 nM em triplicata, usando o mesmo chip sensor C1 ou CAP e parâmetros cinéticos, como descrito acima, exceto que o nível de captura de FcRn fosse aumentado de 10 a 20 vezes para ambos os métodos.

[00285] Os parâmetros cinéticos para as séries de concentração em pH 6,0 foram ajustados em um modelo bivalente usando o Software de Avaliação Biacore T200 devido a efeitos de avidéz. Veja, por exemplo, Suzuki e outros, J. Immunol. (2010) 184: 1968-1976. Cada série de concentração foi ajustada independentemente para obter a média das taxas de dissociação e afinidade de ligação. A aparente afinidade de ligação foi calculada a partir das primeiras taxas de associação e dissociação do modelo bivalente. A ligação residual em pH 7,4 foi medida usando 1000 nM de cada anticorpo em triplicata ao mesmo tempo para comparação da resposta. A resposta no estado estacionário de cada replicado foi calculada para obter a média e o desvio padrão.

Cromatografia de Afinidade com FcRn:

[00286] Em uma experiência, a coluna de afinidade com FcRn foi criada a partir de protocolos adaptados de Schlothauer e outros 2013, mAbs 5: 576-586. Uma coluna de 1 mL de estreptavidina HP HiTrap (GE Healthcare) foi equilibrada com tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM (Sigma) pH 7,4, cloreto de sódio 150 mM (NaCl; Sigma)) em 1 mL min⁻¹ por cinco volumes de coluna seguido por um volume injeção de 4 miligramas de cynoFcRn biotinilado. A coluna foi lavada com tampão de ligação e armazenada a 4°C até o uso.

[00287] A coluna de afinidade com FcRn foi equilibrada com tampão de pH baixo (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico 20 mM (MES; Sigma) pH 5,5; NaCl 150 mM) por cinco volumes de coluna antes da injeção com 300 µg de cada anticorpo. Os pHs das soluções de anticorpo foram ajustados para pH 5,5 com tampão de pH baixo. Após uma lavagem com volume de dez colunas com tampão de pH baixo, os anticorpos foram eluídos por um gradiente de pH linear com tampão de pH alto (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (bis tri) propano; Sigma) pH 9,5; NaCl 150 mM) em 30 volumes de coluna em 1 mL min⁻¹ em frações de 1 mL e monitorando UV₂₈₀. A coluna de afinidade

com FcRn foi re-equilibrada com dez volumes de coluna de tampão de baixo pH para ciclos subsequentes ou tampão de ligação para armazenamento. Todas as variantes foram realizadas em triplicata.

[00288] O perfil de eluição da coluna de afinidade com FcRn para cada variante foi modelado para uma única distribuição Gaussiana usando a Equação 1 no Sigmaplot 11 (Systat Software, Inc.) para determinar o volume de eluição no máximo UV₂₈₀.

$$UV_{280} = y_0 + a \cdot \exp \frac{-(x-x_0)^2}{2b} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde x_0 é o volume de eluição no pico máximo de UV₂₈₀, y_0 é a absorvância da linha de base de UV₂₈₀ e a e b estão relacionados à largura total na metade máxima da distribuição. O pH de cada fração foi medido por um medidor de pH Corning Pinnacle 540 e correlacionado com o volume de eluição usando uma regressão linear.

[00289] Em outro experimento, a coluna de afinidade FcRn foi adaptada de Schlothauer *et al.* 2013, *mAbs* 5: 576-586 com hFcRn biotilado em uma coluna de 1 mL de estreptavidina HP HiTrap (GE Healthcare). A coluna foi injetada com 300 ug de cada anticorpo em tampão de pH baixo (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico a 20 mM (MES; Sigma) pH 5,5; NaCl a 150 mM) em um *AKTA Pure System* (AKTA). Os anticorpos foram eluídos por um gradiente de pH linear criado com tampão de pH baixo e alto (1,3-bis(tris(hidroximetil) metilamino)propano a 20 mM (bis tris propano; Sigma), pH 9,5; NaCl a 150 mM) em 30 volumes de coluna a 0,5 mL de min⁻¹ e monitorando a absorvância e o pH. A coluna foi reequilibrada com tampão de pH baixo para execuções subsequentes. Todas as variantes foram realizadas em triplicado. Os perfis de eluição da coluna de afinidade FcRn foram ajustados a uma única distribuição Gaussiana no Sigmaplot 11 (Systat Software, Inc.) para determinar o volume e o pH da eluição no UV₂₈₀ máximo.

Fluorimetria de Varredura Diferencial:

[00290] Os experimentos de fluorimetria de varredura diferencial (DSF) foram realizados em um termociclador do sistema em tempo real BioRad CFX96 (BioRad) em reações de 20 μL . As amostras de anticorpo e o estoque de 5000x do corante Sypro Orange (Invitrogen) foram diluídos para 0,4 mg de mL^{-1} e 10x, respectivamente, em PBS pH 7,4. Os anticorpos e Sypro Orange foram misturados em uma relação de 1:1 em placas de PCR de 96 cavidades e selados com microadesivo (BioRad) até concentrações finais de 0,2 mg de mL^{-1} de cada anticorpo e 5x corante Sypro Orange. Todas as variantes de anticorpos foram realizadas em triplicado. O programa do termociclador consistiu em uma etapa de equilíbrio de 2 minutos a 20 $^{\circ}\text{C}$, seguida de uma taxa de incremento de temperatura constante de 0,5 $^{\circ}\text{C} / 5 \text{ s}$ para uma temperatura final de 100 $^{\circ}\text{C}$. As medições de fluorescência de cada cavidade foram adquiridas usando os detectores de comprimento de onda de excitação FAM (485 nm) e emissão de ROX (625 nm) adequados para a fluorescência Sypro Orange (veja, por exemplo, Biggar *et al.* 2012, *Biotechniques* 53: 231-238). O perfil de intensidade de fluorescência DSF e o primeiro derivado foram exportados do *BioRad CFX Manager* e analisados no Sigmaplot 11. O T_m foi definido como o ponto médio da primeira transição no perfil de intensidade de fluorescência.

Cinéticas de Ligação ao Fc γ R1IIa:

[00291] As cinéticas de ligação e a afinidade foram medidos usando um instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) (Zhou *et al.*, 2008 *Bio-technol. Bioeng.* 99: 652-665). O anticorpo anti-HPC4 (Roche), a 50 μg de mL^{-1} em acetato pH 4,5, foi acoplado à superfície do chip sensor CM5 durante 600 segundos a 10 μl de min^{-1} com química da amina até uma densidade final de > 20.000 RU. O tampão de execução para os experimentos cinéticos de ligação ao Fc γ R1IIa foi solução salina tam-

ponada com HEPES com tensoativo P-20 a 0,05% (HBS-P +, GE Healthcare) e cloreto de cálcio a 2 mM (CaCl_2 , Fluka) em pH 7,4. Cada traço cinético foi inicializado com a captura de $1,25 \mu\text{g}$ de mL^{-1} de Fc γ RIIIa-V158 marcado com HPC4 durante 30 segundos a $5 \mu\text{l}$ de min^{-1} . Os cinéticos de associação e dissociação a 300 nM de cada variante foram medidos para cada variante durante 120 a 180 segundos para cada etapa de $5 \mu\text{l}$ de min^{-1} . Após a conclusão das medições cinéticas, o chip CM5 foi regenerado com tampão HBS-P+ suplementado com EDTA a 10 mM (Ambion). Antes das próximas medições cinéticas, o chip CM5 foi lavado durante 120 segundos com HBS-P + com CaCl_2 .

[00292] Em um experimento, os experimentos cinéticos de Fc γ RIIIa foram analisados de um modo similar ao descrito para a ligação ao FcRn em pH 7,4. Para o WT, variantes simples e combinadas de derivação de referência, os cinéticos em uma série de uma diluição serial de 3 vezes de 1000 nM foram obtidos para determinar a afinidade de ligação ao Fc γ RIIIa. A RU no estado estacionário em cada concentração e replicação foi determinada, plotada como uma função da concentração de anticorpos e ajustada a um modelo em estado estacionário, como mostrado na Equação 2.

$$\text{RU} = \text{offset} + \frac{(\text{R}_{\text{max}} - \text{offset}) * [\text{Antibody}]}{[\text{Antibody}] + \text{K}_{\text{D,app}}} \quad (\text{Equação 2})$$

[00293] Onde deslocamento for RU de linha de base com anticorpo a 0 nM, $\text{R}_{\text{máx}}$ é a RU platô em altas concentrações de anticorpos, [Anticorpo] é a concentração de anticorpo e $\text{K}_{\text{D,app}}$ é a aparente afinidade de ligação da interação entre as variantes e Fc γ RIIIa.

[00294] Em outro experimento, os experimentos cinéticos de Fc γ RIIIa foram analisados de um modo similar como descrito para a ligação ao FcRn em pH 7,4 utilizando a resposta média de ligação no estado estacionário. Para todas as variantes, a RU no estado estacionário de anticorpo a 300 nM foi determinada em triplicado e em média.

A mudança de duplicação na mudança de resposta em relação ao WT (Mudança de duplicação de resposta) foi determinada para comparação entre as variantes em cada suporte principal.

Foco isoelétrico

[00295] O ponto isoelétrico (pI) das variantes de derivação foi determinado usando eletroforese capilar em um Maurice C (*Protein Simple*). Cada amostra de 200 µL continha 0,35% de metilcelulose (*Protein Simple*), 4% de formalito 3-10 (GE Healthcare), arginina a 10 mM (*Protein Simple*), 0,2 mg de mL⁻¹ de anticorpo e os marcadores pI 4,05 e 9,99 (*Protein Simple*). A amostra foi carregada no capilar durante 1 minuto a 1500 V, seguida por uma fase de separação durante 6 minutos a 3000 V e monitorada usando fluorescência de triptofano. O pI para cada variante foi determinado usando o *software* Maurice C e definido como o pH na fluorescência máxima para as principais espécies.

ELISA de fator Reumatoide em Ponte Homogêneo (RF)

[00296] Os anticorpos foram biotinizados e marcados com digoxigenina usando os *kits* de marcação de anticorpo digoxigenina Eoxlink-Sulfo-NHS-LC-Biotina e Mix-n-Stain™ (*Biotium*) de acordo com as instruções do fabricante. Uma solução mãe contendo 4 µg de mL⁻¹ dos anticorpos biotinizados e marcados com digoxigenina foi preparada para cada variante e misturada em uma relação de 1:1 com 300 U/mL de RF (Abcam). Após a incubação em temperatura ambiente durante 20 horas, 100 µL de cada mistura anticorpo-RF foram adicionados às placas Streptawell (Sigma-Aldrich) e incubados em temperatura ambiente durante 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS pH 7,4 com Tween-20 a 0,05% e 100 µL de uma diluição 1:2000 de anticorpo secundário antidigoxigenina conjugado com HRP (Abcam) foram adicionados a cada cavidade. Após 2 horas de incubação em temperatura ambiente, as cavidades foram lavadas e tratadas com 100 µL do substrato TMB (Abcam) durante 15 minutos em temperatura ambiente. A

reação foi parada com 100 µL da solução de parada (Abcam) e a absorbância foi medida a 450 nm em uma leitora de placas SpectraMax. Uma cavidade que não contém mistura de anticorpo-RF forneceu a subtração em branco e o experimento foi repetido três vezes. Os valores de p foram determinados usando o teste t de estudante.

Farmacocinéticas In Vivo

[00297] Foram realizados estudos farmacocinéticos em macaco cinomolgo e no camundongo transgênico hFcRn (cepa Tg32, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Nos estudos em macacos, as variantes WT, LS, DQ, DW e YD na coluna vertebral mAb2 foram administradas como uma dose intravenosa única de 2,5 mg/kg na veia braquiocefálica com um volume de dose de 1,5 mL/kg, a três cinomolgos machos que não receberam tratamento. Amostras de sangue (0,5 mL) foram coletadas por punção venosa da veia safena em 8 tempos de amostra após a dosagem: 0,0035, 0,17, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Uma vez coletadas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 1500 g e armazenadas a -80°C.

[00298] Nos camundongos hFcRn, as variantes de anticorpo foram administradas como dose intravenosa única de 2,5 mg/kg na veia da cauda com um volume de dose de 5 ml/kg. A cada momento, foram coletados 20 µl de sangue da veia safena utilizando capilares de heparina pré-carregados. As amostras de sangue coletadas foram transferidas em microtubos e centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos e a 4°C. As amostras de plasma foram coletadas, agrupadas para cada ponte de tempo (6 camundongos / amostra) e armazenadas a -80°C antes da análise.

[00299] Todos os estudos *in vivo* foram conduzidos em conformidade com a política institucional de cuidados com animais da Sanofi. Os estudos sobre macacos e camundongos foram aprovados pelo francês

"*Ministère de l'Enseignement Supérieur ET de La Recherche*" e pelo alemão "*Regierungspraesidium Darmstadt*".

[00300] A concentração de cada variante mAb2 em cada ponto do tempo foi determinada por um ensaio LC-MS/MS de baixo para cima. Após precipitação de uma alíquota de plasma, a pélete de plasma foi submetida a uma desnaturação, redução, alquilação, digestão com tripsina e extração em fase sólida de proteínas antes da análise de peptídeos substitutos. Os padrões de calibração foram preparados introduzindo a variante mAb2 no plasma a 1,00, 2,00, 5,00, 10,0, 20,0, 50,0, 100, 200 e 400 $\mu\text{g de mL}^{-1}$. A separação dos peptídeos foi realizada em um sistema Waters Acquity UPLC com uma coluna XBridge BEH C18 de fase reversa (2,1 x 150 mm, 3,5 μM , 300Å, Waters) em uma taxa de fluxo de 300 $\mu\text{L de min}^{-1}$ em um gradiente etapa a etapa de ácido fórmico a 0,1% em água e ácido fórmico a 0,1% em acetoni-trila. Para a detecção, foi utilizado um espectrômetro de massa Sciex API5500 no modo de íon positivo, com a temperatura da fonte a 700°C, a tensão do *ionspray* a 5500 V, os gases cortina e do nebulizador a 40 e o gás de colisão no meio. Os tempos de permanência foram de 20 ms e o potencial de entrada foi de 10 V para cada transição. As transições de monitoramento de reação múltipla para dois peptídeos substitutos únicos da coluna vertebral mAb2 foram usadas para determinação da concentração em relação aos padrões e controles usando a área de pico do algoritmo de integração MQIII do *software Analyst*. A taxa de depuração e a meia-vida sérica foram obtidas a partir de um modelo não compartimental da concentração de anticorpos como uma função do tempo utilizando o *Phoenix Software* (Certara). Todos os pontos de tempo que mostraram uma redução acentuada da concentração foram excluídos da concentração plasmática média devido a, sem estar vinculado a nenhuma teoria, disposição de fármaco

mediada por alvo presumido (TMDD) e/ou interferência de anticorpos antifármacos (ADA).

Exemplo 2: Rastreamento Octet de Mutações de Pontos de Saturação em Meios Condicionados

[00301] FcRn é um heterodímero de um domínio α do tipo MHC da classe I e uma subunidade de β 2-macroglobulina (β 2-m) (Figura 1A), comum à maioria dos receptores Fc, e reconhece regiões sobre a cadeia pesada de anticorpo Fc distintos dos outros Fc γ Rs (veja, por exemplo, Oganesyán *et al.* 2014 J. Biol. Chem. 289: 7812-7824; e Shields *et al.* 2001 *supra*).

[00302] A fim de identificar variantes com taxas de dissociação de FcRn menores do que o anticorpo WT, um ensaio à base de interferometria de biocamada (BLI) foi designado para rastrear as variantes de anticorpos em meios condicionados de maneira de alto rendimento (Figura 2A). Este ensaio foi desenvolvido usando várias variantes de referência que realçam (AAA, LS e YTE) ou reduzem (H435A, H310A / H435Q) a afinidade por FcRn em pH 6,0, em comparação com o anticorpo WT. Os biossensores de NiNTA capturaram o antígeno marcado com his e, subsequentemente, cada variante de anticorpo em pH 7,4 para imitar o meio condicionado (Figura 2A). Os cinéticos de ligação ao FcRn de ratos (rFcRn) em pH 6,0, que têm uma taxa de dissociação ~ 25 vezes mais lenta de IgG1 humano e são mais receptivos aos estudos Octet que o FcRn humano (hFcRn), foram medidos para cada um dos seis variantes (Figura 2B). As variantes H435A (Figura 2B, traços longos intercalados com ponto único) e H310A / H435Q (Figura 2B, traços longos intercalados com dois pontos) mostram pouco a nenhum cinético de ligação ao FcRn (veja também, por exemplo, Shields *et al.* 2001 *supra*; Medesan *et al.* 1997 *supra* e Raghavan *et al.* 1995 *supra*). As variantes AAA (Figura 2B, traços curtos), LS (Figura 2B, traços curtos intercalados com ponto único) e YTE (Figura 2B, traços

longos) exibem cinéticos de dissociação mais lentos em comparação com o WT (Figura 2B, linha sólida) com uma variação de redução de 2-7,3 vezes na taxa de dissociação de FcRn. Isso demonstrou que o rastreamento Octet é adequado para distinguir entre variantes com cinéticos de dissociação de rFcRn perturbados.

[00303] Um anticorpo IgG1, mAb1, serviu como um sistema modelo para criar uma biblioteca de mutagênese de saturação para rastrear mutantes com uma taxa de dissociação de FcRn reduzida. Onze posições na região Fc do mAb1 foram selecionadas com base em sua proximidade ou contribuição direta à interface de FcRn (Figuras 1A e 1B) (veja, por exemplo, Oganessian *et al.* 2014 *supra*; e Shields *et al.* 2001 *supra*). Todas as mutações nestas posições foram construídas usando mutagênese direcionada ao sítio e transfectadas em células Expi293 para expressão. O rastreamento de meio condicionado foi realizado para os mutantes da biblioteca de saturação como descrito acima. Os sensogramas Octet de ligação ao FcRn normalizados para um subconjunto das variantes são mostrados na Figura 2C (traços longos) com o tipo selvagem (Figura 2C, traços longos grossos) e controle falso negativo (Figura 2C, linha pontilhada). A simulação mostrou uma falta de ligação observável ao FcRn. Vários mutantes claramente interromperam a ligação do rFcRn, uma vez que pouca ou nenhuma alteração de sinal foi observada nos perfis cinéticos (Figura 2C, traços longos, localizados abaixo da linha pontilhada (simulação)). O ponto de corte para as variantes com taxa de dissociação de FcRn melhorada foi definido como três desvios padrão inferiores à média do anticorpo WT. No subconjunto de mutações mostradas na Figura 2C, duas (Figura 2C, linhas sólidas) tiveram taxas de dissociação significativamente reduzidas em comparação com o anticorpo tipo selvagem (Figura 2C, traços longos e grossos), enquanto que variantes restantes apresentaram taxas de dissociação de rFcRn similares (Figura 2C, traços curtos in-

tercalados por ponto único) ou mais rápidas (Figura 2C, traços longos acima da linha pontilhada (simulação)).

[00304] As taxas de dissociação de rFcRn para todas as mutações de ponto único são mostradas na Figura 2D e na Figura 14 por posição e mutação. Na Figura 14, os dados são classificados em uma das quatro categorias, dependendo da mudança em duplicidade da taxa de dissociação de rFcRn em comparação com tipo selvagem e as espécies tipo selvagem são indicadas por quadrados pretos.

[00305] Na Figura 14, a alteração em duplicidade da taxa de dissociação de rFcRn para todas as substituições possíveis nas onze posições da biblioteca de saturação foi normalizada para a média do anticorpo WT e codificada por cores. Todos os mutantes se enquadram em uma de quatro categorias: pouca a nenhuma ligação (cinza escuro), taxa de dissociação de rFcRn mais rápida (cinza), taxa de dissociação de rFcRn similar a WT (linhas horizontais) e taxa de dissociação de rFcRn mais lenta (grades). Múltiplas variantes possuíam taxas de dissociação de rFcRn mas lentas do que o anticorpo WT (grades).

[00306] Os mutantes coloridos em cinza escuro na Figura 14 mostraram pouca a nenhuma ligação ao rFcRn de maneira similar à simulação (Figura 2C, linha pontilhada) e localizados nas alças M252, I253 e S254. As únicas mutações em I253 foram metionina e valina, e ambas aumentaram significativamente a taxa de dissociação de rFcRn, apoiando ainda mais a importância de I253 para a interação de FcRn. Outras 120 variantes (Figura 2D e Figura 14, retângulos cinza claro) desestabilizaram a interação com rFcRn com aproximadamente 50% localizados em cada um dos domínios C_H2 e C_H3. Vinte e cinco mutantes têm uma taxa de dissociação similares a WT (Figura 2D e Figura 14, retângulos brancos), com oito das 11 posições possuindo pelo menos uma mutação similar a WT (Figura 14, retângulos brancos). As seguintes mutações apresentaram uma taxa de dissociação de rFcRn

significativamente reduzida em comparação ao tipo selvagem (Figura 2D e Figura 14, retângulos pretos): M252Y, T256D/E, K288D/N, T307A/E/F/M/Q/W, E380C, N434F/P/Y e Y436H/N/W. As mutações M252Y, N434F e N434Y possuíam taxas de dissociação maiores que duas vezes mais lentas que o anticorpo WT (Figura 2D). Essas mutações foram expressas e purificadas com cromatografia de proteína A para outra caracterização cinética de FcRn *in vitro*.

Mutante	Octet pH 6,0	Coluna de Afinidade com DSF FcRn	T _m (°C)	Biacore pH 6,0					Biacore pH 7,4		
				hFcRn			rFcRn		hFcRn	rFcRn	
				Taxa de associação	Taxa de dissociação	K _{D,app}	Taxa de associação	Taxa de dissociação	K _{D,app}	RU em Estado Estacionário	RU em Estado Estacionário
E380C	2,08 ± 0,18	7,18 ± 0,11	54,7 ± 0,5	1,73 ± 0,39	4,57 ± 1,50	>10.000	1,71 ± 0,25	106 ± 1	6310 ± 880	5,7 ± 0,1	27,7 ± 4,0
K288D	3,79 ± 0,06	7,33 ± 0,10	55,8 ± 0,1	3,31 ± 1,10	5,13 ± 0,75	>10.000	5,61 ± 3,01	8,43 ± 0,60	149 ± 63	3,8 ± 0,2	21,9 ± 3,1
K288N	4,11 ± 0,08	7,39 ± 0,02	56,7 ± 0,3	4,12 ± 1,42	4,54 ± 0,34	>10.000	5,42 ± 2,80	10,7 ± 0,9	190 ± 73	3,9 ± 0,2	20,4 ± 2,7
M252Y	0,95 ± 0,03	7,88 ± 0,03	54,4 ± 0,2	5,50 ± 1,83	1,43 ± 0,23	3100 ± 1500	10,6 ± 3,1	2,64 ± 0,62	25 ± 3	8,6 ± 0,9	57,7 ± 10,7
N434F	1,18 ± 0,05	8,30 ± 0,05	57,8 ± 0,2	35,4 ± 15,3	0,50 ± 0,08	165 ± 73	12,6 ± 1,4	3,36 ± 1,79	26 ± 13	20,1 ± 3,4	54,9 ± 9,1
N434P	3,80 ± 0,08	7,56 ± 0,02	53,6 ± 0,5	2,42 ± 0,54	3,35 ± 1,10	>10.000	3,44 ± 0,07	6,67 ± 0,18	194 ± 9	3,5 ± 0,4	4,3 ± 0,6
N434Y	1,33 ± 0,04	8,46 ± 0,02	57,3 ± 0,5	35,9 ± 9,6	0,52 ± 0,10	137 ± 33	14,5 ± 1,82	3,46 ± 1,86	23 ± 12	22,6 ± 4,2	47,0 ± 6,3
T256D	2,24 ± 0,03	7,82 ± 0,07	54,7 ± 0,2	4,41 ± 1,72	2,51 ± 0,65	5700 ± 3540	5,09 ± 1,84	4,84 ± 0,08	86 ± 27	5,8 ± 0,6	30,4 ± 3,4
T256E	3,26 ± 0,04	7,63 ± 0,06	56,3 ± 0,6	0,90 ± 2,37	3,38 ± 0,28	>10.000	5,29 ± 1,59	6,94 ± 0,97	113 ± 15	4,8 ± 0,5	23,0 ± 2,7
T307A	2,98 ± 0,06	7,61 ± 0,03	58,0 ± 0,4	2,85 ± 0,72	2,91 ± 0,46	>10.000	5,09 ± 2,72	7,08 ± 0,67	132 ± 48	5,2 ± 0,6	23,1 ± 2,8
T307E	3,29 ± 0,08	7,58 ± 0,03	70,2 ± 0,5	4,37 ± 1,63	2,98 ± 0,37	3130 ± 5070	5,55 ± 2,82	6,03 ± 0,20	141 ± 65	5,7 ± 0,7	21,5 ± 2,6
T307F	2,80 ± 0,07	7,61 ± 0,03	70,2 ± 0,3	2,70 ± 0,83	2,92 ± 0,13	>10.000	5,69 ± 2,83	6,15 ± 0,14	131 ± 63	4,9 ± 0,7	21,9 ± 2,7
T307M	3,47 ± 0,13	7,40 ± 0,08	70,0 ± 0,4	4,08 ± 0,83	3,87 ± 0,28	>10.000	5,81 ± 2,34	17,1 ± 4,0	279 ± 140	4,4 ± 0,7	15,3 ± 1,9
T307Q	1,84 ± 0,05	7,86 ± 0,06	70,3 ± 0,6	3,96 ± 1,10	2,15 ± 0,22	3720 ± 1530	7,35 ± 2,15	4,04 ± 0,28	58 ± 16	6,4 ± 0,8	24,3 ± 3,0
T307W	2,42 ± 0,08	7,75 ± 0,07	53,0 ± 0,5	3,33 ± 0,83	2,77 ± 0,29	6740 ± 2440	7,11 ± 2,29	7,37 ± 0,41	111 ± 32	5,8 ± 0,7	19,2 ± 3,3
Y436H	3,22 ± 0,08	7,33 ± 0,05	58,7 ± 0,3	2,59 ± 0,78	5,06 ± 1,00	>10.000	5,06 ± 0,13	7,30 ± 0,88	131 ± 9	3,6 ± 0,5	16,3 ± 1,8
Y436N	5,25 ± 0,22	7,22 ± 0,05	55,8 ± 0,5	4,60 ± 2,36	7,37 ± 3,34	>10.000	10,1 ± 4,9	20,3 ± 3,1	233 ± 86	3,6 ± 0,4	17,4 ± 2,0
Y436W	5,18 ± 0,18	7,39 ± 0,03	58,6 ± 0,7	2,84 ± 1,90	4,62 ± 0,92	>10.000	3,44 ± 2,18	23,7 ± 7,7	1140 ± 950	3,7 ± 0,4	10,3 ± 1,2
WT	5,01 ± 0,45	7,37 ± 0,05	58,0 ± 0,2	16,2 ± 2,9	3,86 ± 0,38	2380 ± 470	7,26 ± 1,01	15,2 ± 0,23	207 ± 43	4,3 ± 1,0	12,2 ± 0,5
AAA	3,77 ± 1,03	7,94 ± 0,06	51,3 ± 0,6	8,37 ± 1,82	1,44 ± 0,04	1780 ± 380	15,7 ± 3,3	11,7 ± 1,1	77 ± 18	13,9 ± 3,1	23,6 ± 4,9
LS	3,38 ± 0,23	8,29 ± 0,03	58,5 ± 0,3	19,3 ± 3,5	0,52 ± 0,03	272 ± 40	3,08 ± 1,58	5,58 ± 0,39	74 ± 9	18,3 ± 4,6	24,8 ± 4,8
YTE	0,66 ± 0,17	8,14 ± 0,03	51,2 ± 0,3	14,3 ± 4,4	0,45 ± 0,07	342 ± 117	5,52 ± 0,46	1,21 ± 0,21	18 ± 2	13,2 ± 3,5	53,9 ± 1,2

Exemplo 3: Cinéticas de Ligação ao FcRn Biacore em pH 6,0

[00307] As variantes AAA, LS e YTE serviram como controles positivos nas medições de cinéticos de ligação ao FcRn usando Biacore no FcRn humano e de rato em pH 6,0. A ligação dependente da concentração ao FcRn foi observada para todas as variantes, incluindo o tipo selvagem, referência (Figura 3) e derivações (Figuras 4A e 4B), e o perfil de ligação de uma única injeção com FcRn humano e de rato é mostrado nas Figuras 5A e 5B, respectivamente. O anticorpo tipo selvagem tinha afinidade de ligação para FcRn humano e de rato de afinidades 2380 ± 470 nM e 207 ± 43 nM, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de Caracterização *In Vitro* de Anticorpos de Derivação purificados para mAb1.

[00308] Todos os dados mostrados na Tabela 1 foram obtidos usando as técnicas experimentais mostradas no topo de cada coluna.

[00309] A taxa de dissociação de rFcRn reduzida por Octet usando proteínas purificadas foi medida como uma comparação com as constantes cinéticas obtidas no rastreamento em meios condicionados. O pH da eluição foi determinado por cromatografia de afinidade de FcRn em triplicado ($n = 3$) e o DSF sondou a estabilidade térmica em triplicado ($n = 3$). Os cinéticos de ligação ao FcRn humano e de rato foram obtidos de Biacore com uma série de concentrações de anticorpos em duplicado ($n = 2$) e ajustados independentemente. A resposta de ligação no estado estacionário (RU) de cada variante com FcRn humano e de rato em pH 7,4 foi medida com anticorpo a 1000 nM em triplicado ($n = 3$) usando Biacore. As unidades para cada medição são as seguintes: Taxa de dissociação de rFcRn Octet pH 6,0 ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$); PH de eluição (sem unidade); DSF T_m ($^{\circ}\text{C}$); Taxa de associação de hFcRn Biacore pH 6,0 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Taxa de dissociação ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) e $K_{D, \text{app}}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); Taxa de associação de rFcRn Biacore pH 6,0 ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Taxa de dissociação ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) e $K_{D, \text{app}}$ ($\times 10^9 \text{ M}$); e Resposta de Ligação Estado Estacionário Biacore pH 7,4 (RU).

[00310] Na Figura 5B, as variantes AAA (pontilhadas), LS (traços intercalados por dois pontos) e YTE (traços intercalados por ponto único) apresentaram entre 1,6 e 10,4 vezes maior afinidade de ligação em comparação ao WT. A identidade da variante de referência com afinidade de FcRn mais apertada era específica das espécies, uma vez que LS tinha afinidade mais apertada para hFcRn, enquanto rFcRn tinha afinidade mais apertada para YTE (Tabela 2A).

Tabela 2A: Parâmetros de Caracterização *In Vitro* de Anticorpos de Dupla Combinação Purificados para mAb1.

	Coluna de Afinidade com FcRn	DSF	Biacore pH 6,0						Biacore pH 7,4	
			hFcRn			rFcRn			hFcRn	rFcRn
Variante	pH de Eluição	T _m (°C)	Taxa de associação	Taxa de dissociação	K _{D,app}	Taxa de associação	Taxa de dissociação	K _{D,app}	RU em Estado Estacionário	RU em Estado Estacionário
MDQN	7,92 ± 0,06	67,9 ± 0,4	3,76 ± 0,38	8,72 ± 0,10	232 ± 24	1,33 ± 0,22	1,27 ± 0,07	9,54 ± 1,66	10,7 ± 1,0	39,1 ± 4,5
MDTE	8,41 ± 0,07	62,3 ± 0,2	9,68 ± 0,64	2,90 ± 0,04	29,9 ± 2,0	2,18 ± 0,20	0,39 ± 0,01	1,78 ± 0,17	29,2 ± 4,0	63,0 ± 6,0
MDTY	8,45 ± 0,04	61,5 ± 0,2	18,3 ± 0,6	2,85 ± 0,01	15,6 ± 0,5	4,13 ± 0,15	0,25 ± 0,35	0,60 ± 0,85	37,1 ± 5,0	71,6 ± 6,6
MDWN	7,92 ± 0,04	57,8 ± 0,4	5,29 ± 0,14	8,92 ± 0,32	169 ± 8	1,57 ± 0,12	1,29 ± 0,01	8,24 ± 0,85	12,2 ± 1,3	42,1 ± 4,7
MEQN	7,84 ± 0,06	68,0 ± 0,5	2,87 ± 0,01	14,3 ± 0,2	499 ± 6	1,46 ± 0,25	1,56 ± 0,94	10,7 ± 6,7	5,8 ± 0,6	23,4 ± 3,1
METE	8,23 ± 0,03	64,1 ± 0,7	5,36 ± 1,41	4,19 ± 0,03	78,2 ± 20,5	1,08 ± 0,11	0,81 ± 0,07	7,53 ± 1,03	23,3 ± 3,2	59,0 ± 5,6
METY	8,38 ± 0,04	63,5 ± 0,6	6,28 ± 1,62	3,93 ± 0,02	62,6 ± 16,2	1,27 ± 0,11	0,98 ± 0,07	7,71 ± 0,84	26,8 ± 3,7	62,2 ± 6,3
MEWN	7,78 ± 0,04	58,2 ± 0,4	4,32 ± 0,36	14,0 ± 0,1	323 ± 27	1,81 ± 0,01	1,92 ± 0,05	10,6 ± 0,26	7,7 ± 0,9	33,0 ± 4,2
MTQE	8,56 ± 0,14	69,3 ± 0,2	5,74 ± 1,05	2,46 ± 0,05	42,9 ± 7,9	1,04 ± 0,07	0,40 ± 0,01	3,89 ± 0,26	34,2 ± 4,6	62,5 ± 7,6
MTQY	8,68 ± 0,15	69,2 ± 0,2	6,22 ± 1,38	2,02 ± 0,06	32,4 ± 7,3	1,16 ± 0,06	0,48 ± 0,01	4,11 ± 0,23	38,4 ± 5,2	63,0 ± 7,7
MTWE	8,61 ± 0,06	60,9 ± 0,2	7,87 ± 0,31	3,01 ± 0,08	38,2 ± 1,8	2,11 ± 0,06	0,57 ± 0,01	2,70 ± 0,08	30,5 ± 4,2	65,1 ± 6,4
MTWY	8,62 ± 0,14	62,1 ± 0,5	14,8 ± 0,8	3,17 ± 0,03	21,5 ± 1,2	4,80 ± 0,07	0,30 ± 0,04	0,62 ± 0,08	37,2 ± 4,9	69,6 ± 7,0
YDTN	8,29 ± 0,06	59,6 ± 0,9	6,33 ± 1,23	5,93 ± 0,20	93,6 ± 18,4	2,85 ± 0,11	1,67 ± 0,16	5,86 ± 0,61	9,7 ± 1,8	56,0 ± 5,6
YETN	7,83 ± 0,06	60,7 ± 0,7	5,92 ± 0,05	7,57 ± 0,30	128 ± 5	3,24 ± 0,07	2,73 ± 0,02	8,43 ± 0,20	9,8 ± 1,2	55,1 ± 6,1
YTQN	7,87 ± 0,06	63,1 ± 0,1	3,45 ± 0,29	9,60 ± 0,01	278 ± 23	2,55 ± 0,24	1,05 ± 0,63	4,11 ± 2,51	10,6 ± 1,2	49,2 ± 5,6
YTTE	8,56 ± 0,09	62,2 ± 0,1	12,7 ± 0,7	2,30 ± 0,01	18,0 ± 1,0	4,03 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,29 ± 0,04	43,8 ± 5,8	79,3 ± 9,9
YTTY	8,95 ± 0,02	62,0 ± 0,1	20,6 ± 0,6	1,71 ± 0,02	8,32 ± 0,2	5,40 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,26 ± 0,08	54,1 ± 7,1	67,9 ± 7,9
YTWN	8,14 ± 0,02	59,3 ± 0,2	4,83 ± 0,20	5,70 ± 0,03	118 ± 5	2,08 ± 0,07	1,09 ± 0,03	5,21 ± 0,22	15,9 ± 1,7	66,1 ± 7,1

[00311] Uma grande maioria das variantes de derivação tanto para FcRn humano quanto de rato (Figuras 5A e 5B, linhas sólidas em várias tonalidades) apresentou taxas de associação significativamente mais lentas do que o WT ou as variantes de referência (> 2 vezes) (Tabela 1). As mutações N434F e N434Y foram as únicas variantes que apresentaram uma taxa de associação realçada para as duas espécies de FcRn. Sem estar vinculado a nenhuma teoria, como resultado da cinética de associação mais lenta com hFcRn, as aparentes afinidades de ligação das variantes de derivação eram geralmente mais fracas que o WT, ao contrário do rFcRn (Figuras 5C e 5D, Tabela 1). As afinidades para rFcRn foram mais fracas que a YTE (Figura 5D, linhas diagonais voltadas para o canto inferior esquerdo, Tabela 2A). Sem estar vinculado a nenhuma teoria, esses resultados indicaram que uma única mutação não era suficiente para aumentar a afinidade para superar as variantes LS e YTE. A classificação das taxas de dissociação de FcRn (devido às fracas afinidades de ligação das varian-

tes a hFcRn) revelou um subconjunto com taxas de dissociação reduzidas de FcRn tanto humano quanto de rato: M252Y, N434F/P/Y, T256D/E e T307A/E/F/Q/W (Tabela 2A). Essas variantes são de interesse adicional em combinação para melhorar ainda mais as capacidades de ligação ao FcRn da região Fc para superar as variantes de referência.

[00312] Os parâmetros de caracterização *in vitro* para as variantes de derivação são mostrados na Tabela 2B.

Tabela 2B: Parâmetros de caracterização *in vitro* de variantes de derivação.

mAb1	Coluna de Afinidade com FcRn	DSF	Biacore		Biacore pH 6,0			Biacore pH 7,4	
			FcyRIIIa V158	hFcRn	rFcRn	hFcRn	rFcRn		
Variante	pH	T _m (°C)	Varição da Duplicação de Afinidade	Taxa de Associação	Taxa de Dissociação	K _{D,app}	K _{D,app}	RU em Estacionário	RU em Estacionário
WT	7,37	69,0 ± 0,2	1,00	16,2 ± 2,9	3,9 ± 0,4	2380±470	207 ± 43	4,2 ± 0,9	13,0 ± 3,2
LS	8,29	68,5 ± 0,3	1,04 ± 0,04	1,9 ± 0,4	5,0 ± 0,1	272 ± 40	74 ± 9	18,3 ± 4,6	24,8 ± 4,8
YTE	8,14	61,2 ± 0,3	0,52 ± 0,03	1,4 ± 0,4	4,7 ± 0,1	342 ± 117	18 ± 2	13,2 ± 3,5	53,9 ± 1,2
M252Y	7,88	64,4 ± 0,2	0,46 ± 0,03	5,5 ± 1,8	1,4 ± 0,2	>3000	25 ± 3	8,6 ± 1,0	50,5 ± 5,6
N434F	8,30	67,8 ± 0,2	1,16 ± 0,08	35 ± 15	0,5 ± 0,1	165 ± 73	26 ± 13	22,2 ± 2,6	61,5 ± 6,5
N434Y	8,46	67,3 ± 0,5	1,41 ± 0,06	36 ± 10	0,5 ± 0,1	137 ± 33	23 ± 12	25,5 ± 2,9	66,0 ± 7,1
T256D	7,82	64,7 ± 0,2	0,92 ± 0,04	4,4 ± 1,7	2,5 ± 0,7	>3000	86 ± 27	5,8 ± 0,5	23,2 ± 2,8
T256E	7,63	66,3 ± 0,6	0,89 ± 0,04	3,9 ± 2,4	3,4 ± 0,2	>3000	113 ± 15	4,5 ± 0,4	17,0 ± 2,1
T307Q	7,86	70,3 ± 0,6	1,00 ± 0,04	4,0 ± 1,1	2,2 ± 0,2	>3000	58 ± 16	6,6 ± 0,7	31,3 ± 3,7
T307W	7,75	63,0 ± 0,5	0,97 ± 0,04	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,3	>3000	111 ± 32	5,6 ± 0,7	21,9 ± 2,8
DQ	7,92	67,9 ± 0,4	0,73 ± 0,03	3,8 ± 0,4	8,7 ± 0,1	232 ± 24	9,5 ± 1,7	10,7 ± 1,0	39,1 ± 4,5
DW	7,92	67,8 ± 0,4	0,89 ± 0,04	5,3 ± 0,1	8,9 ± 0,3	169 ± 8	8,2 ± 0,9	12,2 ± 1,3	42,1 ± 4,7
YD	8,29	69,6 ± 0,9	0,48 ± 0,02	6,3 ± 1,2	5,9 ± 0,20	94 ± 18	5,9 ± 0,6	9,7 ± 1,8	56,0 ± 5,6

[00313] Na Tabela 2B, todos os dados foram obtidos usando as técnicas experimentais no topo de cada coluna. A cromatografia de afinidade de FcRn, ligação a DSF e FcyRIIIa foram realizadas em triplicado (n = 3). As cinéticas de ligação de FcRn a FcRn humano e de rato foram obtidas em quadruplicado e ajustadas independentemente. Unidades: DSF T_m (°C); Ligação a FcyRIIIa (variação da duplicação em relação ao TP), Biacore pH 6,0 hFcRn, Taxa de Associação (x10⁴ M⁻¹ s⁻¹), Taxa de Dissociação (x10⁻¹ s⁻¹) e K_{D,app} (x10⁹ M); Biacore pH 6,0 rFcRn K_{D,app} (x 10⁹ M); Biacore pH 7,4 hFcRn e rFcRn Estado estacionário RU (RU).

Exemplo 4: As variantes de combinação diminuem ainda mais a Taxa de Dissociação de ligação de FcRn

[00314] Múltiplas mutações de derivação estavam localizadas em uma única posição (Figura 14, retângulos pretos), como T307 e N434, onde foram identificadas seis e três mutações, respectivamente, que mostraram cinéticas de dissociação mais lenta do FcRn. Apenas mutações com as taxas de dissociação de FcRn mais lentas para hFcRn nessas posições foram usadas para a criação de variantes de combinação. Nesse caso, T307Q, T307W, N434F e N434Y foram misturados com M252Y, T256D e T256E para obter variantes duplas, triplas e quádruplas usando PCR de iniciador misto e mutagênese direcionada ao sítio. No total, a biblioteca de combinações consistiu em 54 variantes, incluindo as sete variantes simples, 18 duplas, 20 triplas, 8 quádruplas e o anticorpo WT. A nomenclatura dessas variantes é a seguinte: a base de tipo selvagem contém M252, T256, T307 e N434 e é marcada como MTTN. Como tal, a variante tripla, YTQY, contém as mutações M252Y, T307Q e N434Y, embora mantendo a treonina WT na posição 256.

[00315] Como nas mutações simples, as cinéticas de ligação ao FcRn em pH 6,0 usando Biacore foram usadas para determinar quais variantes de combinação têm melhor afinidade. Um traço cinético de ligação ao FcRn representativo de cada **único** (traços longos intercalados com dois pontos), **duplo** (traços longos intercalados com um único ponto), **triplo** (traços longos) e **quádruplo** (traços curtos) são mostrados nas Figuras 6A e 6B, em comparação para o WT (linha pontilhada) e a variante de referência com afinidade mais estreita com suas respectivas espécies de FcRn (hFcRn: LS (traços longos intercalados por dois pontos); rFcRn: YTE (linha sólida)). As taxas de associação e dissociação de hFcRn (Figura 6C) revelaram que duas variantes simples, 15 duplas, 18 triplas e oito quádruplas tinham uma afini-

dade de ligação mais realçada do que a variante LS (Figura 6C, pontilhada). Da mesma forma, todas as combinações, exceto uma variante tripla, tinham uma afinidade mais estreita com rFcRn do que a YTE (Figura 6D, linhas diagonais voltadas para o canto inferior esquerdo). No caso do hFcRn, mutações adicionais que realçam FcRn aumentam ainda mais a afinidade de ligação (Figura 6C). As cinco combinações com afinidade mais estreita com hFcRn foram todas variantes quádruplas (Figura 6C, quadriculada) com afinidades de ligação aproximadamente 500 vezes maiores que as tipo selvagem. Fenômeno similar não ocorreu com rFcRn (Figura 6D), visto que as variantes com maior afinidade foram variantes duplas (Figura 6D, linhas horizontais). As variantes triplas (Figura 6D, linhas verticais) e quádrupla (Figura 6D, quadriculada) geralmente exibiam apenas leves reduções na Taxa de Dissociação (menos de 2 vezes), mas também exibiram taxas de associação diminuídas (Figura 6D). Sem estar vinculado a nenhuma teoria, esses resultados sugerem que possivelmente existe um menor limite em relação à afinidade aparente de ligação ao FcRn (aproximadamente 0,5 nM) alcançada com o rFcRn, mas não com o hFcRn (Figura 6B). No total, mais de 40 variantes de combinação tiveram uma afinidade mais estreita do que as variantes de referência e caracterização adicional é requerida para selecionar combinações com propriedades favoráveis para estudos *in vivo*.

Exemplo 5: Variantes de combinação mantêm ligação significativa em pH fisiológico

[00316] Como resultado da afinidade de FcRn significativamente melhorada em pH 6,0, o efeito sobre a dependência do pH foi investigado usando cromatografia de afinidade de FcRn e medições de estado estacionário Biacore em pH 7,4. A cromatografia de afinidade de FcRn emprega um gradiente de pH linear para medir diretamente a perturbação da dependência do pH pelas mutações. H435A e H310A /

H435Q, variantes com fraca ligação a FcRn, não se ligaram à coluna independentemente do pH (Figura 8A). WT eluiu próximo ao pH fisiológico ($\text{pH } 7,37 \pm 0,05$), enquanto o AAA, LS e YTE requereram pH maior (Tabela 2B). Todas as variantes de combinação e as sete variantes simples de derivação requereram um pH maior para eluir da coluna de afinidade do que WT (Figuras 8A e 8C). As variantes N434F/Y eluíram a um pH maior que LS (Tabela 2B) que, sem pretender estar vinculado à teoria científica, indica que essas variantes, sozinhas e em combinação, atrapalharam a dependência do pH. Os cromatogramas representativos mostraram uma mudança clara para um pH de eluição maior com o número de mutações (Figura 9A e 9B). Uma forte correlação ($R^2 = 0,94$) entre o pH da eluição e as taxas de dissociação de hFcRn (Figura 9C) indica que a menor Taxa de Dissociação de FcRn em pH 6,0 contribuiu diretamente para o pH de eluição aumentado para as variantes de FcRn.

[00317] Os experimentos de cinética de ligação ao FcRn foram realizados em pH 7,4 usando Biacore para medir a atividade de ligação residual sob condições fisiológicas. A RU no estado estacionário foi usada como uma medida da afinidade residual de ligação a FcRn, visto que algumas variantes mostraram cinéticas não confiáveis e pouca ou nenhuma ligação a esse pH. Os traços cinéticos representativos das variantes simples (traços longos intercalados com dois pontos), duplo (traços longos intercalados com um único ponto), triplos (traços longos) e quádruplos (traços curtos) são mostrados nas Figuras 7A e 7B, em comparação com LS (Figura 7A, sólido) e YTE (Figura 7B, sólido). Estas duas variantes exibiram a maior ligação residual ao FcRn humano e de rato em pH 7,4, respectivamente. A maioria das variantes simples de derivação apresentou ligação ao FcRn ligeiramente elevada em comparação com o WT ($4,3 \pm 1,0$ RU), mas menor que o AAA ($13,1 \pm 1,7$ RU), LS ($18,5 \pm 2,6$ RU) e YTE ($13,1 \pm 1,6$ RU), exce-

to para as mutações N434F/Y (Tabelas 2A e 2B). As variantes de combinação também possuíam ligação residual significativa a ambas as espécies de FcRn em pH 7,4 (Figuras 7A e 7B) em uma extensão ainda maior do que N434F/Y. Sem estar vinculado a nenhuma teoria, um candidato ideal para estudos *in vivo* são variantes com ligação ao FcRn aumentada em pH baixo (tal como as variantes AAA, LS e YTE), mas mantêm um baixo nível de ligação em pH elevado, de maneira similar ao WT. Num gráfico mostrado nas Figuras 7C e 7D, essas combinações ocupariam o quadrante inferior esquerdo designado pelas afinidades das variantes LS e YTE em cada pH para FcRn humano e de rato, respectivamente.

Exemplo 6: Cromatografia de afinidade com FcRn

[00318] As variantes de combinação exibiram uma correlação positiva moderada (hFcRn: $R^2 = 0,69$, rFcRn: $R^2 = 0,71$) entre a aparente afinidade de ligação em pH 6,0 e a RU em estado estacionário em pH 7,4 (Figuras 7C e 7D). Sem estar vinculado a nenhuma teoria, esses resultados indicam que uma maior afinidade em pH 6,0 normalmente se traduz em uma maior ligação residual ao FcRn em pH 7,4. Essas variantes podem permanecer ligadas a FcRn na corrente sanguínea e ter meias-vidas séricas curtas e/ou promover sua depuração, similar às mutações abdeg de alta afinidade com o FcRn (ver, por exemplo, Swiercz et al. 2014 supra; e Vaccaro et al. 2005 supra). Como a interação anticorpo-FcRn é dependente do pH e ocorre apenas em pH baixo ($< \text{pH } 6,5$), as mutações de saturação podem fortalecer a interação por meio de contribuições hidrofóbicas ou derivadas de carga, que podem interromper a desprotonação dos resíduos críticos da histidina (Figura 1B, como indicado) e enfraquecimento dessa interação em pH fisiológico.

[00319] A cromatografia de afinidade com FcRn emprega um gradiente de pH linear para medir diretamente a perturbação da dependên-

cia do pH das interações de FcRn (ver, por exemplo, Schlothauer et al. 2013 supra). A cromatografia de afinidade de FcRn com as variantes AAA, LS, YTE, H435A e H310A / H435Q revelou que H435A (Figura 8A, linha cinza clara sólida) e H310A / H435Q (Figura 8A, AQ, linha cinza escura sólida) não se ligam a FcRn mesmo em pH 5,5 e eluem no fluxo. O anticorpo tipo selvagem eluiu próximo ao pH fisiológico (pH $7,37 \pm 0,05$), enquanto o AAA, LS e YTE, que têm taxas de dissociação mais lentas e afinidades de ligação ao FcRn mais estreitas do que o tipo selvagem Octet (Figura 2) e Biacore (Figura 3), requereram um pH consideravelmente mais alto para se dissociar da coluna (AAA: $7,94 \pm 0,06$; LS: $8,29 \pm 0,03$; YTE: $8,14 \pm 0,03$). Os perfis de eluição revelaram que todas as variantes na biblioteca de combinações requereram um pH mais alto para eluir da coluna de afinidade do que o tipo selvagem. Cromatogramas representativos no pH médio de eluição para as variantes simples (traços longos intercalados com dois pontos), dupla (traços longos intercalados por um único ponto), triplas (traços longos) e quadruplicadas (traços curtos) são mostradas na Figura 9A. As sete variantes simples de derivação requereram um pH mais alto para se dissociar da coluna em comparação com o WT (Figura 10A, Tabela 3), embora aquelas com cinéticas tipo selvagem para hFcRn (K288D/N, Y436H/H/ W) todas eluíram em um pH similar ao tipo selvagem.

Tabela 3: Parâmetros de caracterização *in vitro* de variantes de anticorpos de derivação

Variante	Coluna de Afinidade com DSF FcRn		Biacore pH 6,0					
	pH	T _m (°C)	hFcRn			rFcRn		
			Taxa de Associação (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Taxa de Dissociação (x10 ⁻¹ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	Taxa de Associação (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Taxa de Dissociação (x10 ⁻³ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)
WT	7,37	69,0 ± 0,2	16,2 ± 2,9	3,9 ± 0,4	2380 ± 470	7,3 ± 1,0	15,2 ± 0,2	207 ± 43
E380C	7,18	64,7 ± 0,5	1,7 ± 0,4	4,6 ± 1,5	>10.000	1,7 ± 0,25	106 ± 1	6310 ± 880
K288D	7,33	65,8 ± 0,1	3,3 ± 1,1	5,1 ± 0,8	>10.000	6,6 ± 3,0	8,4 ± 0,6	149 ± 63
K288N	7,39	66,7 ± 0,3	4,1 ± 1,4	4,5 ± 0,3	>10.000	6,4 ± 2,8	10,7 ± 0,9	190 ± 73
M252Y	7,88	64,4 ± 0,2	5,5 ± 1,8	1,4 ± 0,2	3100 ± 1500	10,6 ± 3,1	2,6 ± 0,6	25 ± 3
N434F	8,30	67,8 ± 0,2	35 ± 15	0,5 ± 0,1	165 ± 73	12,6 ± 1,4	3,4 ± 1,8	26 ± 13

Variante	Coluna de Afinidade com FcRn	DSF	Biacore pH 6,0					
			hFcRn			rFcRn		
pH	T _m (°C)	Taxa de Associação (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Taxa de Dissociação (x10 ⁻¹ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	Taxa de Associação (x10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	Taxa de Dissociação (x10 ⁻³ s ⁻¹)	K _{D,app} (x10 ⁹ M)	
N434P	7,56	63,6 ± 0,5	2,4 ± 0,5	3,4 ± 1,1	>10.000	3,4 ± 0,1	6,7 ± 0,2	194 ± 9
N434Y	8,46	67,3 ± 0,5	36 ± 10	0,5 ± 0,1	137 ± 33	14,5 ± 1,8	3,5 ± 1,9	23 ± 12
T256D	7,82	64,7 ± 0,2	4,4 ± 1,7	2,5 ± 0,7	6700 ± 3540	6,1 ± 1,8	4,8 ± 0,1	86 ± 27
T256E	7,63	66,3 ± 0,6	3,9 ± 2,4	3,4 ± 0,2	>10.000	6,3 ± 1,6	6,9 ± 1,0	113 ± 15
T307A	7,61	68,0 ± 0,4	2,9 ± 0,7	2,9 ± 0,5	>10.000	6,1 ± 2,7	7,1 ± 0,7	132 ± 48
T307E	7,58	70,2 ± 0,5	4,4 ± 1,6	3,0 ± 0,4	8130 ± 5070	5,6 ± 2,8	6,0 ± 0,2	141 ± 65
T307F	7,61	70,2 ± 0,3	2,7 ± 0,8	2,9 ± 0,1	>10.000	5,7 ± 2,8	6,2 ± 0,1	131 ± 63
T307M	7,40	70,0 ± 0,4	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,3	>10.000	6,8 ± 2,3	17,1 ± 4,0	279 ± 140
T307Q	7,86	70,3 ± 0,6	4,0 ± 1,1	2,2 ± 0,2	5720 ± 1530	7,4 ± 2,2	4,0 ± 0,3	58 ± 16
T307W	7,75	63,0 ± 0,5	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,3	8740 ± 2440	7,1 ± 2,3	7,4 ± 0,4	111 ± 32
Y436H	7,33	68,7 ± 0,3	2,6 ± 0,8	6,1 ± 1,0	>10.000	5,1 ± 0,1	7,3 ± 0,9	131 ± 9
Y436N	7,22	65,8 ± 0,5	4,6 ± 2,4	7,4 ± 3,3	>10.000	10,1 ± 4,9	20,3 ± 3,1	233 ± 86
Y436W	7,39	68,6 ± 0,7	2,8 ± 1,9	4,6 ± 0,9	>10.000	3,4 ± 2,2	23,7 ± 7,7	1140 ± 950

[00320] Todos os dados foram obtidos usando as técnicas experimentais no topo de cada coluna. O pH da eluição foi determinado por cromatografia de afinidade com FcRn em triplicado (n = 3) e o DSF sondou a estabilidade térmica em triplicado (n = 3). As cinéticas de ligação de FcRn ao FcRn humano e de rato foram obtidas da Biacore com uma série de concentrações de anticorpos (n = 4) e ajustadas independentemente. As unidades para cada medição são as seguintes: pH da eluição (sem unidade); DSF T_m (°C); Biacore pH 6,0 Taxa de Associação de hFcRn (x10⁴ M⁻¹ s⁻¹), Taxa de Dissociação (x10⁻¹ s⁻¹) e K_{D,app} (x10⁹ M); Biacore pH 6,0 Taxa de Associação de rFcRn (x10⁴ M⁻¹ s⁻¹), Taxa de Dissociação (x10⁻³ s⁻¹) e K_{D,app} (x10⁹ M).

[00321] As variantes N434F/Y eluíram em um pH maior que a variante LS (N434F: 8,30 ± 0,05; N434Y: 8,46 ± 0,02) e mostraram considerável ligação ao FcRn em pH 7,4 (Tabela 4). Esses resultados indicam que essas variantes sozinhas podem atrapalhar a dependência do pH. Em geral, o pH médio da eluição aumentou com o aumento do número de mutações de realce da ligação ao FcRn (Figura 9B). Uma forte correlação (R² = 0,94) apareceu com o pH da eluição em comparação com as taxas de dissociação de hFcRn (Figura 9C); sem estar vinculada a nenhuma teoria, indicando que o rompimento da depen-

dência do pH da interação contribui diretamente para as taxas de dissociação FcRn mais lentas observadas para a biblioteca de combinações em pH 6,0.

Exemplo 7: Estabilidade térmica

[00322] A maioria das proteínas, incluindo anticorpos, com baixa estabilidade termodinâmica, tem uma propensão aumentada dobra imperfeita e agregação e limitaria ou dificultaria sua atividade, eficácia e potencial como novas terapêuticas. A estabilidade térmica de cada variante foi determinada usando DSF e a temperatura de fusão relatada (T_m) foi definida como o ponto médio da primeira transição no perfil de intensidade de fluorescência Sypro Orange. Em comparação com WT com uma T_m de $69,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, a variante LS é semelhante a WT ($68,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$) e AAA e YTE são desestabilizadas termicamente em $\sim 8^\circ\text{C}$ (AAA: $61,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$; YTE: $61,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$) (Figuras 8B, 9B e 10B; e Tabelas 2B, 3 e 4). Em comparação a WT e LS com T_m de $69,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, as variantes AAA e YTE apresentaram menores estabilidades térmicas em $\sim 8^\circ\text{C}$ pelo DSF.

Tabela 4: Parâmetros de caracterização *in vitro* das combinações de referência e de derivação

Variante	Coluna de Afinidade com FcRn	DSF	Biacore pH 6,0			Biacore pH 7,4			FcγRIIIa V158		
			T_m (°C)	Taxa de Associação ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Taxa de Dissociação ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)	rFcRn	rFcRn		$K_{D,app}$ ($\times 10^9 \text{ M}$)	
WT	7,37	$69,0 \pm 0,2$	$16,2 \pm 2,9$	$3,9 \pm 0,4$	2380 ± 470	$7,3 \pm 1,0$	$15,2 \pm 0,2$	207 ± 43	RU em Estado Estacionário	RU em Estado Estacionário	467 ± 99
AAA	7,94	$61,3 \pm 0,6$	$8,4 \pm 1,8$	$1,4 \pm 0,1$	1780 ± 380	$15,7 \pm 3,3$	$11,7 \pm 1,1$	77 ± 18	$13,9 \pm 3,1$	$23,6 \pm 4,9$	450 ± 19
LS	8,29	$68,5 \pm 0,3$	$19,3 \pm 3,5$	$0,5 \pm 0,1$	272 ± 40	$9,1 \pm 1,6$	$6,6 \pm 0,4$	74 ± 9	$18,3 \pm 4,6$	$24,8 \pm 4,8$	369 ± 19
YTE	8,14	$61,2 \pm 0,3$	$14,3 \pm 4,4$	$0,5 \pm 0,1$	342 ± 117	$6,5 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	18 ± 2	$13,2 \pm 3,5$	$53,9 \pm 1,2$	1040 ± 160
<u>MDQN</u>	7,92	$67,9 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,1$	232 ± 24	$1,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$9,5 \pm 1,7$	$10,7 \pm 1,0$	$39,1 \pm 4,5$	600 ± 4
<u>MDWN</u>	7,92	$57,8 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,3$	169 ± 8	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,9$	$12,2 \pm 1,3$	$42,1 \pm 4,7$	512 ± 30
<u>YDTN</u>	8,29	$59,6 \pm 0,9$	$6,3 \pm 1,2$	$5,9 \pm 0,20$	94 ± 18	$2,9 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,6$	$9,7 \pm 1,8$	$56,0 \pm 5,6$	1060 ± 60
<u>YETN</u>	7,83	$60,7 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,1$	$7,6 \pm 0,3$	128 ± 5	$3,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,2$	$9,8 \pm 1,2$	$55,1 \pm 6,1$	878 ± 101

YTWN	8,14	59,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,7 ± 0,1	118 ± 5	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	15,9 ± 1,7	66,1 ± 7,1	896 ± 53
YDQN	8,51	60,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,8 ± 0,1	115 ± 7	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3	19,8 ± 2,7	65,2 ± 6,6	1060 ± 50
YEQN	8,12	61,9 ± 0,8	1,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	218 ± 6	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	7,8 ± 0,4	15,2 ± 2,1	61,8 ± 6,4	1620 ± 210

[00323] As mutações introduzidas na cadeia principal tipo selvagem estão em negrito e sublinhadas. Todos os dados foram obtidos usando as técnicas experimentais mostradas no topo de cada coluna. O pH da eluição e T_m foram determinados em triplicado ($n = 3$). As cinéticas de ligação de FcRn ao FcRn humano e de rato em pH 6,0 foram obtidas da Biacore ($n = 4$) e ajustadas independentemente. A resposta de ligação ao FcRn no estado estacionário em pH 7,4 foi medida utilizando Biacore a uma concentração única de anticorpo em triplicado. A afinidade de ligação ao FcγRIIIa foi determinada a partir de uma série de concentrações de anticorpos em duplicado usando Biacore. As unidades para cada medição são as seguintes: pH da eluição (sem unidade); DSF T_m (°C); Biacore pH 6,0, Taxa de Associação de hFcRn ($\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$), Taxa de Dissociação ($\times 10^{-2} s^{-1}$) e $K_{D,app}$ ($\times 10^9 M$); Biacore pH 6.0 Taxa de Associação de rFcRn ($\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$), Taxa de Dissociação ($\times 10^{-3} s^{-1}$) and $K_{D,app}$ ($\times 10^9 M$); Biacore pH 7.4 Resposta de Ligação em Estado Estacionário (RU) e FcγRIIIa $K_{D,app}$ ($\times 10^9 M$).

[00324] Doze das 18 variantes de saturação de derivação tiveram um T_m reduzido em comparação com o tipo selvagem, e vários dos mutantes T307 (T307E/F/M/Q) mostraram uma leve estabilização (Tabela 4). Nenhuma das sete variantes simples usadas para combinações (Figura 10B e Tabela 4) foi significativamente desestabilizada em relação ao YTE (Figura 8B e Tabela 5). A adição de variantes duplas (Figura 9D, linhas horizontais), triplas (Figura 9D, linhas verticais) e quádruplas (Figura 9D, quadriculadas) levou a um decréscimo adicional na estabilidade térmica geral em comparação com as variantes simples (Figura 9D, círculos brancos). Múltiplas variantes exibiram T_m menor que AAA ou YTE ($61,2 \pm 0$ °C), com > 60% dessas variantes

contendo T307W. As variantes quádruplas (Figura 9D, quadriculada) mostraram uma distribuição bimodal distinta das temperaturas de fusão com combinações contendo T307Q com aproximadamente 6°C mais estabilidade térmica do que aquelas que possuíam T307W (Figura 9D).

Exemplo 8: As variantes Fc alteram a interação de ligação com FcγRIIIa

[00325] Além da interação com FcRn, a articulação das regiões Fc e os domínios C_H2 são responsáveis pela interação com outros receptores Fc, incluindo FcγRIIIa. Como cinco das sete variantes simples usadas para a construção da biblioteca de saturação de combinação estão localizadas no domínio C_H2, a capacidade de interagir com esses receptores pode ser comprometida em relação ao tipo selvagem, apesar de sua localização longe da interface de interação. O uso do Biacore para medir a ligação ao FcγRIIIa de maneira semelhante à ligação ao FcRn em pH 7,4, revelou que a variante YTE (Figura 11A, cinza escuro) mostrou uma redução de aproximadamente 50% na resposta de ligação em comparação com o tipo selvagem (Figura 11A, preto). Sem estar vinculada a nenhuma teoria, a ligação reduzida de FcγRIIIa ao YTE é resultado da mutação M252Y (Figura 11B, menor círculo branco), pois essa variante sozinha tem uma afinidade significativamente reduzida para esse receptor. As outras mutações simples não compartilharam essa afinidade reduzida (Figura 11B, círculos brancos) e apenas as variantes N434F/Y aumentaram a ligação em 16 a 40%. Esses efeitos foram transferidos para a maioria, mas não todas, de suas combinações correspondentes. Por exemplo, as combinações contendo M252Y tiveram entre 17 e 72% de redução na ligação ao FcγRIIIa (Tabela 5).

Tabela 5: Concentrações das variantes da biblioteca de saturação em meios condicionados

Posição											
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
Mutante	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										
A	89,4	3,4	99,5	4,5	106	< 0,1	110	206	173	108	22,0
C	< 0,1	0,2	108	< 0,1	< 0,1	< 0,1	323	< 0,1	138	31,8	< 0,1
D	22,7	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	169	127	133	< 0,1	2,2
E	< 0,1	136	93,0	163	< 0,1	23,5	167	WT	2,7	65,9	8,9
F	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	154	127	118	< 0,1	< 0,1
G	46,7	< 0,1	172	106	< 0,1	4,9	124	146	107	< 0,1	< 0,1
H	< 0,1	< 0,1	< 0,1	207	< 0,1	7,0	229	103	124	< 0,1	173
I	< 0,1	WT	< 0,1	193	53,9	< 0,1	63,0	60,2	182	16,3	< 0,1
K	1,2	4,1	< 0,1	3,2	WT	88,8	WT	69,2	25,0	< 0,1	67,0
L	< 0,1	< 0,1	103	124	< 0,1	< 0,1	181	169	WT	77,7	< 0,1
M	WT	80,0	1,5	122	< 0,1	< 0,1	112	76,8	97,3	30,5	90,1
N	< 0,1	< 0,1	89,6	46,8	< 0,1	126	231	190	235	WT	18,9
P	0,7	< 0,1	18,5	2,7	92,6	< 0,1	1,3	175	< 0,1	120	< 0,1
Q	176	35,7	20,9	123	1,0	14,0	216	197	188	55,4	96,9
R	0,8	< 0,1	< 0,1	189	< 0,1	1,5	209	9,1	142	102	25,0
S	< 0,1	71,1	WT	141	< 0,1	88,8	99,3	153	106	< 0,1	3,0
T	19,7	12,5	< 0,1	WT	83,8	WT	218	176	114	75,2	34,1
V	63,6	89,9	67,1	150	< 0,1	< 0,1	88,9	239	114	68,0	18,0
W	2,8	< 0,1	< 0,1	2,9	4,9	< 0,1	66,8	171	< 0,1	21,6	128
Y	0,7	< 0,1	150	117	< 0,1	1,1	143	11,3	26,1	< 0,1	WT

[00326] Uma variante, MDQF (Figura 11B, mais alta na categoria de variante tripla), mostrou um aumento dramático de 140% na ligação ao Fc γ R11a. Desse modo, a biblioteca de saturação de combinação ofereceu variantes com uma ampla gama de funcionalidades do receptor Fc que poderiam ser aproveitadas para adaptar anticorpos terapêuticos com funções efetoras específicas.

[00327] A Figura 11C mostra um gráfico de caixa das respostas de ligação ao FcγRIIIa das sete variantes simples de derivação em comparação com as variantes WT e YTE.

Exemplo 9: Sete combinações de derivação equilibram a dependência do pH da interação de FcRn

[00328] Sem estar vinculado a nenhuma teoria, as variantes candidatas para estudos adicionais in vivo ocuparam o quadrante inferior esquerdo dos gráficos mostrados nas Figuras 7C e 7D. Sete variantes atenderam a esses critérios para hFcRn e compreenderam cinco combinações duplas e duas triplas (MDQN, MDWN, YDTN, YETN, YTWN, YDQN e YEQN) e não continham uma mutação na posição N434 (Tabela 3). Cada uma dessas combinações eluiu da coluna de afinidade de FcRn entre AAA (pH $7,94 \pm 0,06$) e LS (pH $8,29 \pm 0,03$) com YDQN eluindo no pH mais alto de $8,51 \pm 0,14$ (Figura 12A, Tabela 5), indicando apenas uma leve perturbação na dependência do pH e maior ligação residual a pH 7,4 (Tabela 2A). Uma das variantes (MDQN) possuía uma estabilidade térmica do tipo selvagem e seis tinham um T_m semelhante ou reduzido em comparação com a variante YTE (Figura 12B, Tabela 4). Em um ensaio de ligação ao FcγRIIIa, cinco variantes de combinação mostraram uma redução semelhante à YTE (Tabela 4). Outra investigação com as mutações simples revelou que M252Y afetou significativamente a ligação ao FcγRIIIa e, sem estar vinculado a nenhuma teoria, traduz esse efeito em combinações com essa mutação. As seis mutações simples restantes eram do tipo WT ou possuíam uma ligação ligeiramente melhorada a este receptor.

[00329] Três variantes de combinação foram selecionadas para estudos posteriores com base em suas propriedades de ligação ao FcRn, estabilidade térmica e ligação ao FcγRIIIa. DQ (T256D / T307Q), DW (T256D / T307W) e YD (M252Y / T256D) forneceram propriedades ideais de ligação ao FcRn (Tabela 2B) como a variante

LS (Figura 12E). Cada variante oferece uma gama diversificada de propriedades de estabilidade térmica e de ligação ao FcγRIIIa (Figuras 12F e 12G, Tabela 2B) que forneceram uma gama de funcionalidades. A Figura 12H é um gráfico de RF de ligação por ponte homogênea.

[00330] O realce em afinidade de ligação aparente para FcRn humano e de rato em pH 6,0 em comparação com o LS (Figura 13A, traços longos e grossos) e as variantes YTE (Figura 13B, traços longos e grossos), respectivamente, foi um comprometimento entre as taxas de associação e de dissociação (Figuras 13A e 13B, Tabela 4). Normalmente, combinações com taxas de dissociação mais rápidas também possuem taxas de associação mais rápidas e vice-versa. Esta observação foi mantida entre FcRn humano e de rato (Tabela 4). Além disso, todas essas variantes tiveram uma resposta em estado estacionário mais baixa do que a variante LS (Figura 13C, traços longos e grossos) ao hFcRn em pH 7,4. Esses resultados não foram consistentes com o rFcRn, visto que as cinco variantes que contêm M252Y, YDTN, YETN, YTWN, YDQN e YEQN, apresentaram ligação ao FcRn elevada em pH 7,4 (Figura 13, Tabela 5) em comparação com o YTE. As variantes MDQN e MDWN foram as únicas combinações que foram reativas de forma cruzada entre FcRn humano e de rato. Além disso, essas duas variantes não perturbaram a interação com FcγRIIIa em uma extensão semelhante às variantes contendo M252Y (Figuras 12C e 12D e Tabela 5; MDQN: 600 ± 4 nM; MDWN: 512 ± 30 nM; WT: 467 ± 99 nM). Desse modo, a mutagênese de saturação e combinação em posições chave de interação com FcRn levou à identificação de que variantes de derivação que equilibraram a dependência do pH da interação, mantiveram a funcionalidade com um receptor Fc, poderiam melhorar a funcionalidade do FcRn *in vivo* e estender a meia-vida sérica de anticorpos terapêuticos.

Exemplo 10: Características de ligação do fator reumatoide de variantes de combinação de derivação

[00331] O ponto isoelétrico e a ligação de RF das variantes de derivação foram investigados, visto que essas mutações podem alterar a carga da superfície do anticorpo e a imunogenicidade. Anticorpos mais acídicos foram considerados prolongar as farmacocinéticas do anticorpo. Em comparação a WT e LS, todas as três derivações eletrodos resultaram em uma redução de ~ 0,2 unidade de pH no pI, como resultado da substituição do T256D. As mutações que realçam o FcRn podem alterar simultaneamente a ligação aos anticorpos hospedeiros, tal como o fator reumatoide (RF), devido à sobreposição das interfaces de interação. Um ELISA de ponte homogênea foi adaptado para medir a alteração na ligação de RF para as variantes de derivação. Curiosamente, LS e YTE mostraram mudanças completamente opostas na ligação de RF em comparação com WT (Figura 12H). LS aumentou significativamente a ligação ao RF, enquanto o YTE mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,001$). YD ($p < 0,001$) e DW ($p < 0,01$) também reduziram significativamente a ligação à RF, enquanto o DQ produziu uma resposta semelhante a WT. Sem estar vinculado a nenhuma teoria, esses resultados indicam que DQ, DW e YD podem fornecer uma vantagem imunogênica em comparação com a LS. As variantes YD, DW e DQ representam uma gama de características chave de anticorpos que podem ser aproveitadas em conjunto com as propriedades de ligação ao FcRn melhoradas em relação às variantes de referência YTE e LS.

Exemplo 11: Variantes de combinação de derivação são transferíveis para outros anticorpos

[00332] Um novo ensaio de ligação foi desenvolvido usando um chip sensor CM5, como representado na Figura 15A. O ensaio de ligação inclui uma etapa para imobilizar a estreptavidina em um chip sen-

tor CM5 para capturar FcRn biotilado a cerca de 30 RU, reabastecido conforme necessário. As cinéticas de ligação ao anticorpo foram medidas em pH 6,0 e 7,4 e pH 8,5 para regeneração. As Figuras 15B e 15C mostram a imobilização direta de FcRn e captura de estreptavidina de FcRn biotilado, respectivamente, utilizando o novo ensaio de ligação.

[00333] Ligação de FcRn do Anticorpo-2 em pH 6,0: Com o FcRn de camundongo, variantes de Anticorpo-2 de derivação demonstram taxas de dissociação mais lentas do que a variante LS (traços) e tipo selvagem (preto) (Figura 16A). Para o FcRn humano, todas as variantes de derivação têm taxas de associação mais rápidas, mas taxas de dissociação similares a LS (traços) (Figura 16B).

[00334] Ligação de FcRn do Anticorpo-2 em pH 7,4: Todas as variantes de derivação mostraram uma ligação ao FcRn humano reduzida em pH 7,4 em comparação com LS (traços) (Figura 17A). Como a base do Anticorpo-1, as variantes DW (MDWN) e DQ (MDQN) também mostraram menor ligação residual ao FcRn de camundongo (rato) em pH 7,4 (Figura 17B).

[00335] As variantes de derivação mantiveram uma maior afinidade de ligação em pH 6,0 e uma menor ligação residual em pH 7,4 em comparação com LS (Figura 18). De maneira importante, verificou-se que as variantes são transferíveis entre diferentes bases de IgG1 com pouco efeito sobre a ligação de FcRn. Como mostrado na Figura 19, o LS tinha um pH de eluição semelhante, independentemente da base. WT, DQ e DW na base do Anticorpo-2 mostraram um maior pH de eluição na base do Anticorpo-1, possivelmente como um resultado de uma ligação mais estreita em pH 6,0 na base do Anticorpo-2.

[00336] Todas as variantes de fundo do anticorpo-2 mostraram uma estabilidade térmica ligeiramente aumentada, como mostrado na Figura 20.

[00337] Como mostrado na Figura 21, similarmente à base do Anticorpo-1, o YD (YDTN) mostrou uma redução na resposta de ligação ao FcγRIIIa (esquerda) e afinidade (direita). DQ (cinza claro) e DW (cinza escuro) mostraram propriedades de ligação ao FcγRIIIa similares a WT (preta) na base do Anticorpo-2. O efeito sobre a ligação de FcγRIIIa para LS é consistente entre o Anticorpo-1 e o Anticorpo-2.

[00338] Desse modo, as variantes de derivação na base do Anticorpo-2 não afetam significativamente a ligação ao FcRn, a dependência do pH, a estabilidade térmica ou a ligação ao FcγRIIIa em comparação com as mesmas variantes de derivação na base do Anticorpo-1.

[00339] Em uma modalidade, as variantes DQ (T256D/T307Q), DW (T256D/T307W) e YD (M252Y/T256D) foram incorporadas a um anticorpo IgG1 adicional e um fragmento Fc recombinante: mAb2 reconhece um antígeno diferente de mAb1, e Ab3 é um Fragmento Fc. Em cada caso, as cinéticas de ligação ao FcRn dependente de pH (Figura 22) foram altamente similares em adição ao pH da eluição, estabilidade térmica e afinidades de ligação ao FcγRIIIa (Tabela 2B e Tabela 6). Sem estar vinculado a nenhuma teoria, esses resultados indicam que as variantes DQ, DW e YD conferiram suas propriedades de ligação ao FcRn melhoradas a proteínas que consistem em um domínio Fc.

Tabela 6: Concentrações das variantes da biblioteca de saturação em meios condicionados

Ab	Variante	Coluna de		Biacore	Biacore pH 6,0			Biacore pH 7,4		
		Afinidade com FcRn	DSF		FcγRIIIa V158	hFcRn	cFcRn	mFcRn	hFcRn	cFcRn
		pH	T _m	Variação da Duplicação de Afinidade	*K _{D,app}	*K _{D,app}	*K _{D,app}	RU em Estacionário	RU em Estacionário	RU em Estacionário
2	WT	7,61	69,3 ± 0,1	1,0	678 ± 97	1440±360	107 ± 9	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	92 ± 8
2	LS	8,32	69,0 ± 0,1	1,23±0,02	113 ± 22	210 ± 43	20 ± 9	44 ± 4	38 ± 6	285 ± 8
2	DQ	8,06	69,3 ± 0,1	1,05±0,01	97 ± 33	110 ± 42	24 ± 11	14 ± 1	11 ± 1	248 ± 5
2	DW	8,11	58,1 ± 0,1	1,15±0,01	69 ± 25	99 ± 9	13 ± 5	18 ± 2	15 ± 1	257 ± 8
2	YD	8,25	60,5 ± 0,1	0,58±0,01	99 ± 49	120 ± 6	10 ± 3	27 ± 2	22 ± 3	394 ± 11
3	WT	7,62	67,5 ± 0,2	1,0	717 ± 23		61 ± 1	2,2 ± 0,3		72 ± 2
3	LS	8,32	66,6 ± 0,2	1,11±0,03	51 ± 2		16 ± 2	32 ± 2		103 ± 1

3	DQ	8,07	63,8 ± 0,2	0,87±0,02	51 ± 1		24 ± 1	19 ± 2		89 ± 1
3	DW	8,12	57,1 ± 0,2	0,93±0,02	39 ± 6		23 ± 1	22 ± 2		99 ± 1
3	YD	8,23	59,5 ± 0,1	0,73±0,02	54 ± 1		0,5 ± 0,2	28 ± 3		125 ± 2

Exemplo 12: Variantes de derivação estenderam a meia-vida de eliminação de anticorpos plasmáticos in vivo

[00340] As farmacocinéticas (PK) das variantes DQ, DW e YD foram examinada quanto ao seu efeito sobre a meia-vida de circulação do anticorpo com macacos cinomolgos e camundongos transgênicos hFcRn (cepa Tg32) (ver, por exemplo, Avery et al. Mabs (2016) 8: 1064-1078) em comparação com os controles WT e LS. Os estudos de ligação de FcRn com FcRn de cinomolgo revelaram afinidades de ligação similares ao hFcRn (Figuras 23A-23B; Tabela 6). Cada animal foi injetado por via intravenosa com as variantes WT, LS, DQ, DW ou YD, e a concentração de anticorpos foi quantificada por meio de um método de espectrometria de massa para determinar a taxa de depuração e a meia-vida sérica em macacos (Figura 24A) e camundongos transgênicos hFcRn (Figura 24B). As taxas de depuração e as meias-vidas séricas foram obtidas a partir de um modelo não compartimental da concentração de anticorpos como uma função de tempo. Todas as três variantes de derivação e LS mostraram uma taxa de depuração significativamente reduzida em comparação a WT tanto em macacos quanto em camundongos ($p < 0,001$). A meia-vida plasmática do anticorpo WT foi de $9,9 \pm 0,5$ e $11,7$ dias para macacos e camundongos, respectivamente. Além disso, a referência de LS e as variantes identificadas exibiram um aumento significativo da meia-vida de eliminação em comparação com o tipo selvagem em ambas as espécies (aumento de 2,5 e 1,7 vezes no macaco e camundongo, respectivamente) (Tabela 7). DQ, DW e YD mostraram um prolongamento similar da meia-vida em comparação com a referência LS (Tabela 7). As mutações DQ, DW e YD aqui identificadas por meio da mutagênese de saturação demonstraram meia-vida plasmática significativamente prolongada do

que suas contrapartes WT tanto em modelos de camundongos quanto de animais primatas não humanos.

Tabela 7: Taxas de liberação e meias-vidas séricas das variantes de referência e de derivação

mAb2	Macaco Cinomolgo (n = 3)				Camundongo hFcRn Tg32 (n = 6)			
	Depuração (mL dia ⁻¹ kg ⁻¹)	t _{1/2} (dias)			Depuração (mL dia ⁻¹ kg ⁻¹)	t _{1/2} (dias)		
Variante	Média ± SD	Média ± SD	Duplicação vs. WT	Duplicação vs. LS	Média	Média	Duplicação vs. WT	Duplicação vs. LS
WT	5,6 ± 0,5	9,9 ± 0,5	1,0	0,4	7,4	11,7	1,0	0,6
LS	2,1**	22,5 ± 2,4	2,3	1,0	4,6	19,5	1,7	1,0
DQ	3,4*	20,8	2,1	0,9	3,2	24,5	2,1	1,3
DW	2,5 ± 0,2	20,4 ± 0,9	2,1	0,9	3,5	20,1	1,7	1,0
YD	2,4 ± 0,3	23,5 ± 2,1	2,4	1,0	4,5	17,5	1,5	0,9

[00341] Na Tabela 7, a taxa de depuração e as meias-vidas plasmáticas foram determinadas usando mAb2. Cada taxa de depuração e meia-vida foi a média de n = 3 para o macaco cinomolgo e uma única avaliação de um grupo de n = 6 camundongos transgênicos hFcRn. Duplicação vs. WT e Duplicação vs. LS mostram a melhora relativa na meia-vida sérica em comparação com WT e LS, respectivamente. * n = 2 devido à formação de ADA, ** n = 2 devido à via de administração subcutânea parcial

Exemplo 13: Variantes de combinação com ligação realçada de FcRn em pH 6,0 e pH 7,4

[00342] Com base na análise Octet (análise com base em BLI), como descrito no Exemplo 2, foram geradas várias variantes simples, duplas, triplas e quádruplas e avaliadas sua ligação ao FcRn em pH 6,0 e pH 7,4 (Tabela 8).

Tabela 8: Afinidade de ligação (pH 6,0) e ligação em estado estacionário (pH 7,4) das variantes

Variante	Tipo	Afinidade de Ligação (M ⁻¹)	Erro de Afinidade de Ligação (M ⁻¹)	Ligação em Estado Estacionário, pH 7,4 (RU)	Erro da Ligação em Estado Estacionário, pH 7,4 (RU)	Relação (pH 6,0 / pH 7,4)	Relação (pH 6,0 / pH 7,4)
WT	Referência	420000	83000	4,2	0,9	100000	1,00E-05

(MTTN)							
AAA	Referência	562000	120000	13,9	3,1	40432	2,47E-05
LS	Referência	3680000	541000	18,3	4,6	201093	4,97E-06
YTE	Referência	2920000	1000000	13,2	3,5	221212	4,52E-06
MDQN	Dupla	4310000	446000	10,7	1	402804	2,48E-06
MDTF	Dupla	33400000	2240000	29,2	4	1143836	8,74E-07
MDTY	Dupla	64100000	2050000	37,1	5	1727763	5,79E-07
MDWN	Dupla	5920000	280000	12,2	1,3	485246	2,06E-06
MEQN	Dupla	2000000	24100	5,8	0,6	344828	2,90E-06
METF	Dupla	12800000	3350000	23,3	3,2	549356	1,82E-06
METY	Dupla	16000000	4130000	26,8	3,7	597015	1,68E-06
MEWN	Dupla	3100000	259000	7,7	0,9	402597	2,48E-06
MTQF	Dupla	23300000	4290000	34,2	4,6	681287	1,47E-06
MTQY	Dupla	30900000	6950000	38,4	5,2	804688	1,24E-06
MTWF	Dupla	26200000	1230000	30,5	4,2	859016	1,16E-06
MTWY	Dupla	46500000	2600000	37,2	4,9	1250000	8,00E-07
YDTN	Dupla	10700000	2100000	9,7	1,8	1103093	9,07E-07
YETN	Dupla	7810000	305000	9,8	1,2	796939	1,25E-06
YTQN	Dupla	3600000	298000	10,6	1,2	339623	2,94E-06
YTTF	Dupla	55600000	3090000	43,8	5,8	1269406	7,88E-07
YTTY	Dupla	120000000	2890000	54,1	7,1	2218115	4,51E-07
YTWN	Dupla	8470000	359000	15,9	1,7	532704	1,88E-06
MDQF	Tripla	6620000	1840000	55,3	11,2	119711	8,35E-06
MDQY	Tripla	36900000	4360000	49,4	6,7	746964	1,34E-06
MDWF	Tripla	28100000	2840000	47,1	6,4	596603	1,68E-06
MDWY	Tripla	84000000	9890000	59	7,9	1423729	7,02E-07
MEQF	Tripla	142000	6490	8,6	0,8	16512	6,06E-05
MEQY	Tripla	23800000	2660000	38,6	5,2	616580	1,62E-06
MEWF	Tripla	56200000	8520000	41,9	5,6	1341289	7,46E-07
MEWY	Tripla	70400000	7440000	46,6	6,3	1510730	6,62E-07
YDQN	Tripla	8700000	560000	19,8	2,7	439394	2,28E-06
YDTF	Tripla	29600000	2540000	57,7	7,7	512998	1,95E-06
YDTY	Tripla	90100000	812000	65,4	8,9	1377676	7,26E-07
YDWN	Tripla	10100000	1540000	25,9	3,6	389961	2,56E-06
YEQN	Tripla	4590000	126000	15,2	2,1	301974	3,31E-06
YETY	Tripla	33400000	3580000	22,6	2,9	1477876	6,77E-07
YEWN	Tripla	6410000	904000	69,6	9,3	92098	1,09E-05
YTQF	Tripla	56500000	1280000	59,9	8	943239	1,06E-06
YTQY	Tripla	63300000	4010000	71,5	9,6	885315	1,13E-06
YTWF	Tripla	65400000	2990000	62,6	8,2	1044728	9,57E-07
YTWY	Tripla	106000000	10600000	75,1	9,8	1411451	7,08E-07
YDQF	Quádrupla	111000000	4320000	68,6	10	1618076	6,18E-07
YDQY	Quádrupla	235000000	6060000	80,2	12	2930175	3,41E-07
YDWF	Quádrupla	166000000	3050000	71,8	9,9	2311978	4,33E-07
YDWY	Quádrupla	266000000	19100000	88,5	11,7	3005650	3,33E-07

[00343] Na Tabela 8, são mostradas afinidade de ligação ao FcRn em pH 6,0 e ligação em estado estacionário a FcRn em pH 7,4 para vários mutantes simples, duplos, triplos e quádruplos, bem como variantes de referência (AAA, LS, YTE).

[00344] Estes valores estão representados na Figura 25. A Figura 25 mostra uma comparação da afinidade de ligação em pH 6,0 e a RU em pH 7,4. Como mostrado, a variante de referência LS tem a afinidade de ligação mais estreita em pH 6,0 e a maior ligação residual em pH 7,4 das variantes de referência testadas (AAA, LS, YTE).

[00345] Foi determinado que várias variantes de combinação mostradas na Figura 25 exibiram afinidade de ligação ao FcRn aumentada em pH 6,0 e em pH 7,4. Para investigar se alguma das variantes de combinação mostrou uma ligação mais estreita que a variante MST-HN (referida aqui como "a referência YTEKF") contendo mutações em Met252, Ser254, Thr256, His433 e Asn434 a Tyr252, Thr254, Glu256, Lys433 e Phe434) em pH 6,0 e pH 7,4, a seguinte metodologia foi realizada. A captura de FcRn biotilado humano, de cinomolgo e de camundongo foi realizada pelo método Biotin CAPture (veja a Figura 26 para esquemáticos). Para pH 6,0, uma série de concentrações (5 pts) de 1000 nM foi realizada em duplicado. Para pH 7,4, uma injeção de única concentração (1000 nM) foi realizada em triplicado (o nível de captura de cada FcRn foi aumentado 10 vezes para observar a ligação nesse pH). Associação: 180 s; Dissociação: 300 s.

[00346] As cinéticas de ligação ao FcRn humano em pH 6,0 da referência YTEKF e várias variantes de combinação são mostradas na Figura 27. Como mostrado na Figura 27, todas as variantes examinadas mostraram uma afinidade mais estreita de duas ordens de magnitude com o FcRn humano em comparação com o tipo selvagem (WT).

[00347] As Figuras 28A e 28B mostram as cinéticas de ligação ao FcRn das variantes de combinação em comparação com a referência YTEKF em pH 6,0 (Figura 28A) e em pH 7,4 (Figura 28B). Na Figura 28A, a maioria das variantes exibiu taxas de dissociação mais lentas do que a referência YTEKF e teve taxas de associação similares ou mais lentas. Na Figura 28B, YTEKF exibe ligação significativa em pH 7,4, e quatro variantes mostram uma ligação residual mais alta.

Tabela 9: Afinidade de ligação (pH 6,0) e ligação em estado estacionário (pH 7,4) de variantes selecionadas

FcRn Humano	pH 6,0		pH 7,4	
Variante	KD (nM)	SD	RU	SD
YDQY	2,7	0,1	103,1	0,6

YEWY	8,3	0,5	98,2	0,9
YEQY	4,8	0,2	93,6	0,8
YDQF	4,7	0,1	91,7	0,6
YDWY	5,2	0,2	91,2	0,5
YTEKF	14,8	0,3	89,9	1,3
YWY	10,0	0,4	77,1	0,3
YDWF	11,0	0,4	75,7	0,5
YDY	15,1	0,8	69,7	0,4
DWY	18,1	1,1	59,8	0,8
YY	22,9	0,9	54,4	0,1
WT	1288	201	0,4	0,1

[00348] Na Tabela 9, são mostradas afinidade de ligação ao FcRn em pH 6,0 e ligação em estado estacionário a FcRn em pH 7,4 para variantes de combinação selecionadas, bem como a referência YTEKF e WT.

[00349] A Figura 29 mostra uma comparação da afinidade de ligação em pH 6,0 e a RU em pH 7,4 para variantes de combinação selecionadas, conforme indicado na Tabela 9. Como mostrado na Tabela 9 e Figura 29, quatro variantes quádruplas foram descobertas ter uma maior afinidade em pH 6,0 e pH 7,4 para FcRn comparado à referência YTEKF. As quatro variantes quádruplas favoreceram as mutações T256D, T307Q e N434Y. Essas variantes quádruplas exibiram uma melhoria de aproximadamente 500 vezes e 3 vezes na afinidade (em pH 6,0) sobre WT e YTEKF, respectivamente.

[00350] Outros parâmetros de caracterização, por exemplo, estabilidade térmica, ligação ao FcγRIIIa e pH da eluição foram determinados e mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Outros parâmetros de caracterização de variantes quádruplas de derivação

Variante	Afinidade, pH 6,0 (nM)	RU em Estado Estacionário, pH 7,4	Tm (°C)	Ligação a FcγRIIIa (RU)	pH de Eluição
YDQY	2,7	103,1	59,0	119	9,2
YEWY	8,3	98,2	52,7	92	9,3
YEQY	4,8	93,6	59,5	108	9,1
YDQF	4,7	91,7	59,1	93,2	8,8
YDWY	5,2	91,2	52,5	104	9,5
WT	~1500	<1	69,0	142	7,37
YTEKF	14,8	89,9	N.P.*	N.P.*	N.P.

* Sem pretender ser vinculado pela teoria, devido à presença de "YTE" em YTEKF, espera-se que a estabilidade térmica e a ligação ao FcγRIIIa sejam similares às variantes quádruplas de derivação [00351] Como mostrado na Tabela 10, todas as variantes quádruplas de derivação foram mostras ser termicamente desestabilizadas e exibiram capacidades reduzida de ligação ao FcγRIIIa.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

um ácido aspártico (D) ou um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256 e/ou um triptofano (W) ou uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que a posição do aminoácido 254 não é treonina (T) e que compreende ainda:

uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; ou

uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252,

em que as posições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

2. Polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado caracterizado pelo fato de que compreende uma combinação de substituições de aminoácidos nas posições selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256;

b) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434;

c) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434;

d) um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434;

e) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434;

f) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434;

g) um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434;

h) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434; e

i) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434;

em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

3. Polipeptídeo de ligação isolado compreendendo um domínio Fc modificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) uma substituição de aminoácidos dupla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D, M252Y/T256E, M252Y/T307Q, M252Y/T307W, T256D/T307Q, T256D/T307W, T256E/T307Q e T256E/T307W, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434; ou

b) uma substituição de aminoácidos tripla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D/T307Q, M252Y/T256D/T307W, M252Y/T256E/T307Q e M252Y/T256E/T307W, em que uma treonina (T) não está na posição do aminoácido 254, uma histidina (H) não está na posição do aminoácido 311 e uma tirosina (Y) não está na posição do aminoácido 434;

em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

4. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado.

5. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

6. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano.

7. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn de rato.

8. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

9. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

10. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

11. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o

polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

12. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

13. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

14. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado.

15. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que a afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação a FcRn reduzida.

16. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0.

17. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0 e o pH não ácido é de cerca de 7,4.

18. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o

polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

19. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

20. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

21. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma afinidade de ligação ao FcγRIIIa que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

22. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

23. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem aproximadamente a mesma estabilidade térmica que um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc modificado tendo a substituição de aminoácidos tripla M252Y/S254T/T256E, de acordo com a numeração de EU.

24. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo.

25. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal.

26. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 e 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

27. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

28. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado se liga especificamente a um ou mais alvos humanos.

29. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28.

30. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico isolada, como definida na reivindicação 29.

31. Vetor, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor de expressão.

32. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 30 e 31.

33. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica.

34. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 33, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem mamífera.

35. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 e 33, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem bacteriana.

36. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28.

37. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 24 a 27.

38. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, de acordo com a numeração de EU.

39. Polipeptídeo de ligação isolado que compreende um domínio Fc modificado, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado compreende um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256 e um triptofano (W) na posição do aminoácido 307, de acordo com a numeração de EU.

40. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado, em que o domínio Fc modificado compreende uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252 e um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, de acordo com a numeração de EU.

41. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 40, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado.

42. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 41, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

43. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 42, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano.

44. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 42, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn de rato.

45. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 44, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica aumentada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

46. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 44, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realizada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

47. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 44, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realizada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

48. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 47, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realizada em um pH ácido em comparação com a afinidade de ligação ao FcRn do polipeptídeo de ligação em um pH não ácido elevado.

49. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, caracterizado pelo fato de que a afinidade de ligação ao FcRn realçada compreende uma taxa de dissociação de ligação ao FcRn reduzida.

50. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0.

51. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é cerca de 6,0 e o pH não ácido é cerca de 7,4.

52. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0.

53. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 52, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

54. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 53, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal.

55. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 54, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

56. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 55, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado se liga especificamente a um ou mais alvos humanos.

57. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo

isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 38 a 56.

58. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico isolada, como definida na reivindicação 57.

59. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão, como definido na reivindicação 58.

60. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 38a 58.

61. Polipeptídeo de ligação isolado, compreendendo um domínio Fc modificado, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado compreende uma combinação de pelo menos quatro substituições de aminoácidos compreendendo:

um ácido aspártico (D) ou um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256 e um triptofano (W) ou uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307, em que a posição do aminoácido 254 não é treonina (T), e compreendendo ainda:

uma fenilalanina (F) ou uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434; e

uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252,

em que as posições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

62. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado tendo uma combinação de substituições de aminoácidos em posições selecionadas a partir do grupo que consiste em:

a) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434;

b) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434;

c) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434;

d) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434; ou

e) uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434,

em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

63. Polipeptídeo de ligação isolado, compreendendo um domínio Fc modificado, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma substituição de aminoácidos quádrupla selecionada a partir do grupo que consiste em M252Y/T256D/T307Q/N434Y, M252Y/T256E/T307W/N434Y, M252Y/T256E/T307Q/N434Y, M252Y/T256D/T307Q/N434F, e M252Y/T256D/T307W/N434Y,

em que as substituições de aminoácidos estão de acordo com a numeração de EU.

64. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado.

65. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qual-

quer uma das reivindicações 61 a 64, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

66. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 65, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano.

67. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 65, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn de rato.

68. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 67, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano e de rato.

69. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 68, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

70. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com as reivindicações 61 a 69, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

71. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 70, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

72. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 71, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn real-

çada em um pH ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

73. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 72, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

74. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 73, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

75. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 74, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem.

76. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 75, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

77. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 76, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0.

78. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 77, caracterizado pelo fato de que o pH não ácido é de cerca de 7,4.

79. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 78, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

80. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 79, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

81. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 80, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

82. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 81, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa alterada em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

83. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 82, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

84. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 83, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

85. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 84, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

86. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 85, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

87. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 86, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo.

88. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 87, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal.

89. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 88, caracterizado pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

90. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 89, caracterizado pelo fato de que o anticorpo isolado é um anticorpo de tamanho natural.

91. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 90, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado se liga especificamente a um ou mais alvos.

92. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 61 a 91.

93. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a

molécula de ácido nucleico isolada, como definida na reivindicação 92.

94. Vetor, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor de expressão.

95. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 93 e 94.

96. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 95, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem eucariótica ou procariótica.

97. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 e 96, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem mamífera.

98. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 e 96, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é de origem bacteriana.

99. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 61 a 92.

100. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 87 a 90.

101. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU.

102. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico

(E) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU.

103. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido glutâmico (E) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU.

104. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, uma glutamina (Q) na posição do aminoácido 307 e uma fenilalanina (F) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU.

105. Polipeptídeo de ligação isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio Fc modificado compreendendo uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 252, um ácido aspártico (D) na posição do aminoácido 256, um triptofano (W) na posição do aminoácido 307 e uma tirosina (Y) na posição do aminoácido 434, de acordo com a numeração de EU.

106. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 105, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc humano modificado.

107. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 106, caracterizado pelo fato de que o domínio Fc modificado é um domínio Fc de IgG1 modificado.

108. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 107, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação tem afinidade de ligação ao FcRn humano.

109. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 108, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

110. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 109, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem uma meia-vida sérica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

111. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 110, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem.

112. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 111, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH ácido e afinidade de ligação ao FcRn realçada em um pH não ácido, em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

113. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 111 ou 112, caracterizado pelo fato de que o pH ácido é de cerca de 6,0 e o pH não ácido é de cerca de 7,4.

114. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 113, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação que compreende um domínio Fc tipo selvagem.

115. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 114, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem afinidade de ligação ao FcγRIIIa reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

116. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 115, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida como um polipeptídeo de ligação compreendendo um domínio Fc tipo selvagem.

117. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 116, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado tem estabilidade térmica reduzida em comparação com um polipeptídeo de ligação compreendendo M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F.

118. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 117, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado é um anticorpo monoclonal.

119. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

120. Polipeptídeo de ligação isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 119, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de ligação isolado se liga especificamente a um ou mais alvos.

121. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 101 a 120.

122. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico isolada, como definida na

reivindicação 121.

123. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 122.

124. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 101 a 120.

125. Método de tratamento de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 38 a 58, 61 a 91 e 101 a 120, ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 36 e 37, 60, 99 e 100 e 124.

126. Método, de acordo com a reivindicação 125, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é um câncer.

127. Método, de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o câncer é um tumor.

128. Método, de acordo com a reivindicação 125, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é um distúrbio autoimune.

129. Método para tratar um câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 e 38 a 58, ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 36, 37 e 60.

130. Método de tratar um distúrbio autoimune em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que

compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo de ligação isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 61 a 91 e 101 a 120, ou a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 99, 100 e 124.

FIG. 1A

FIG. 1B

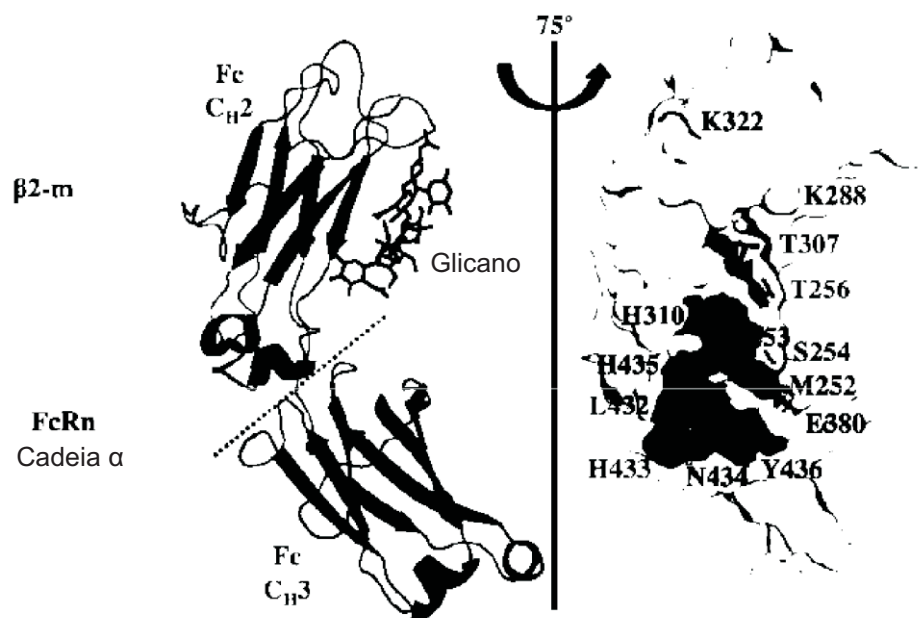


FIG. 2A

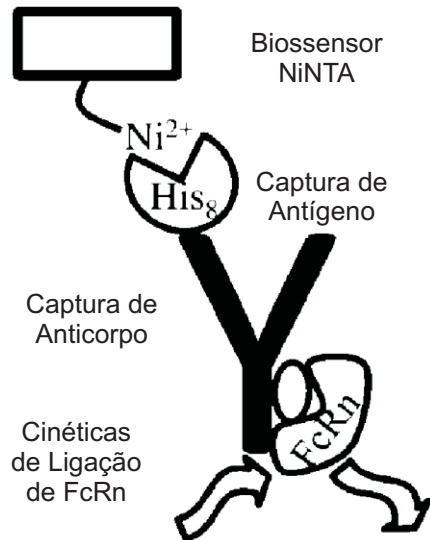


FIG. 2B

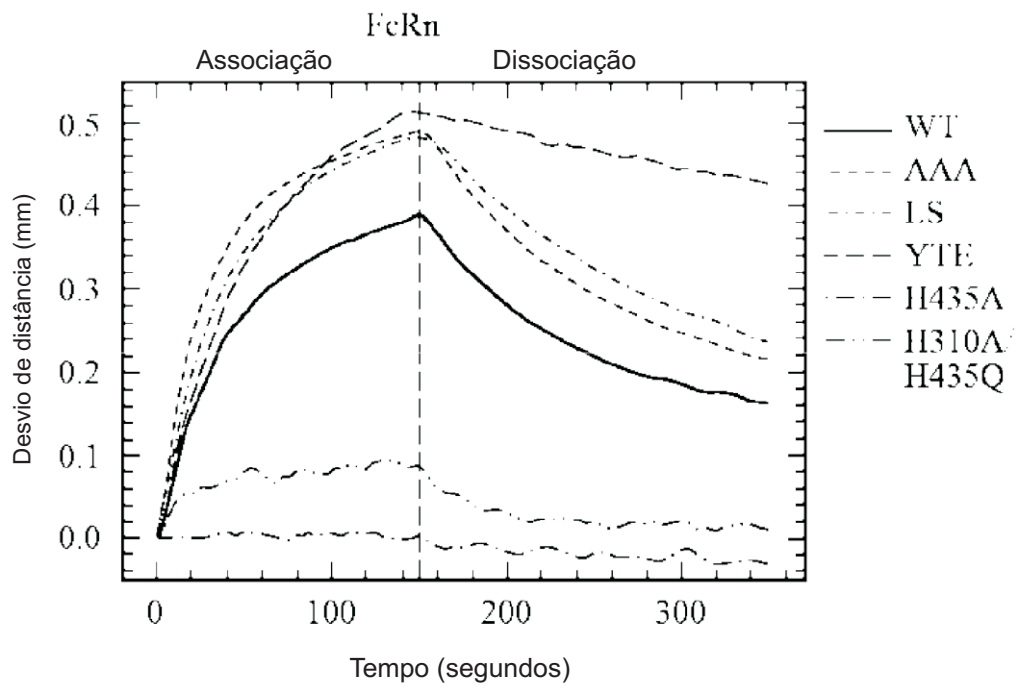


FIG. 2C

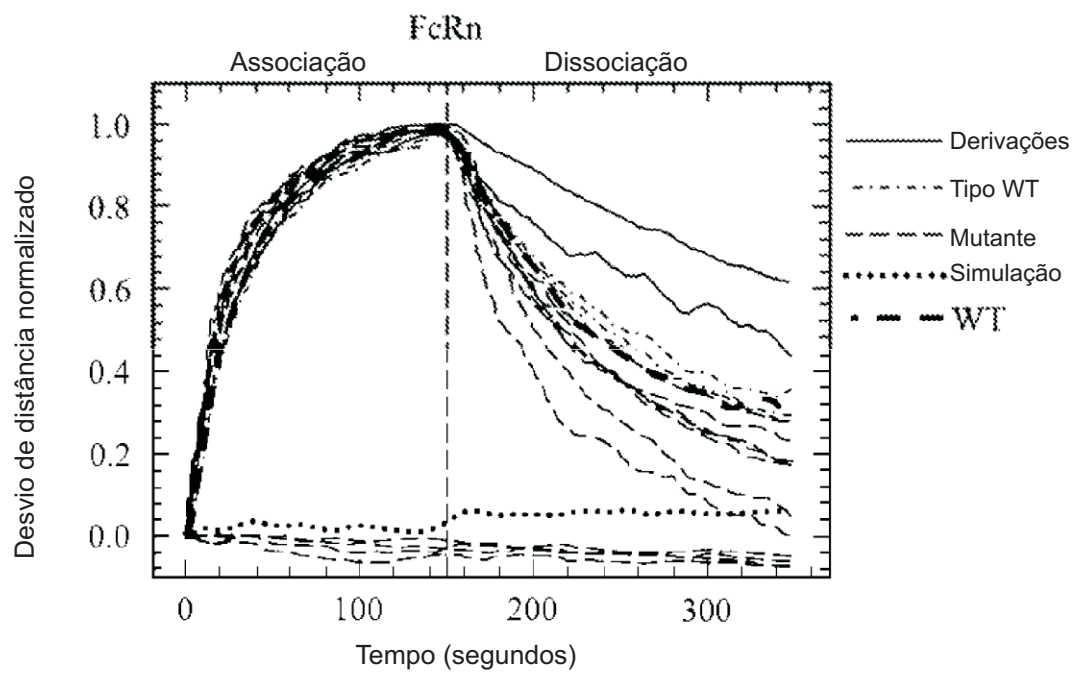


FIG. 2D

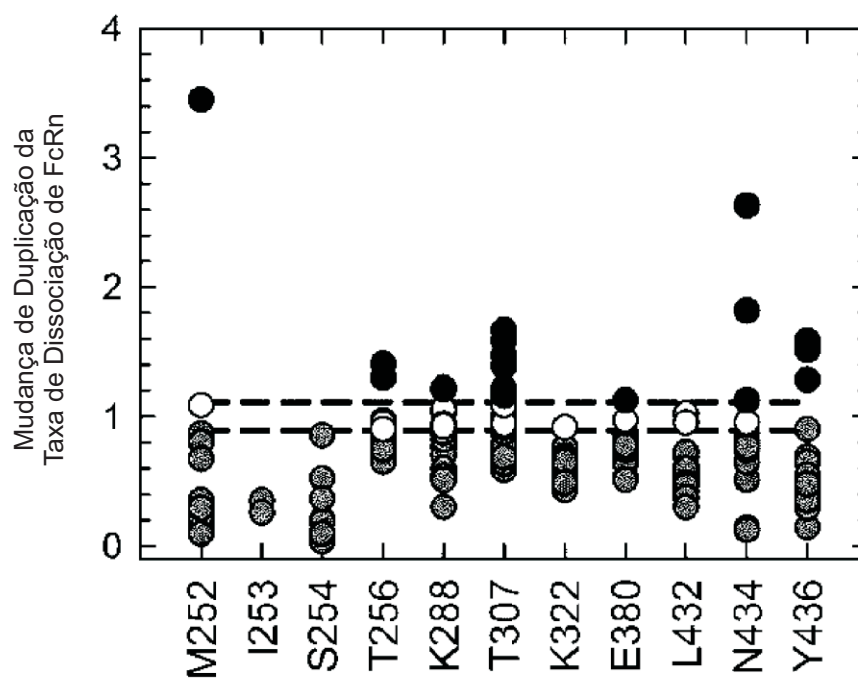


FIG. 3

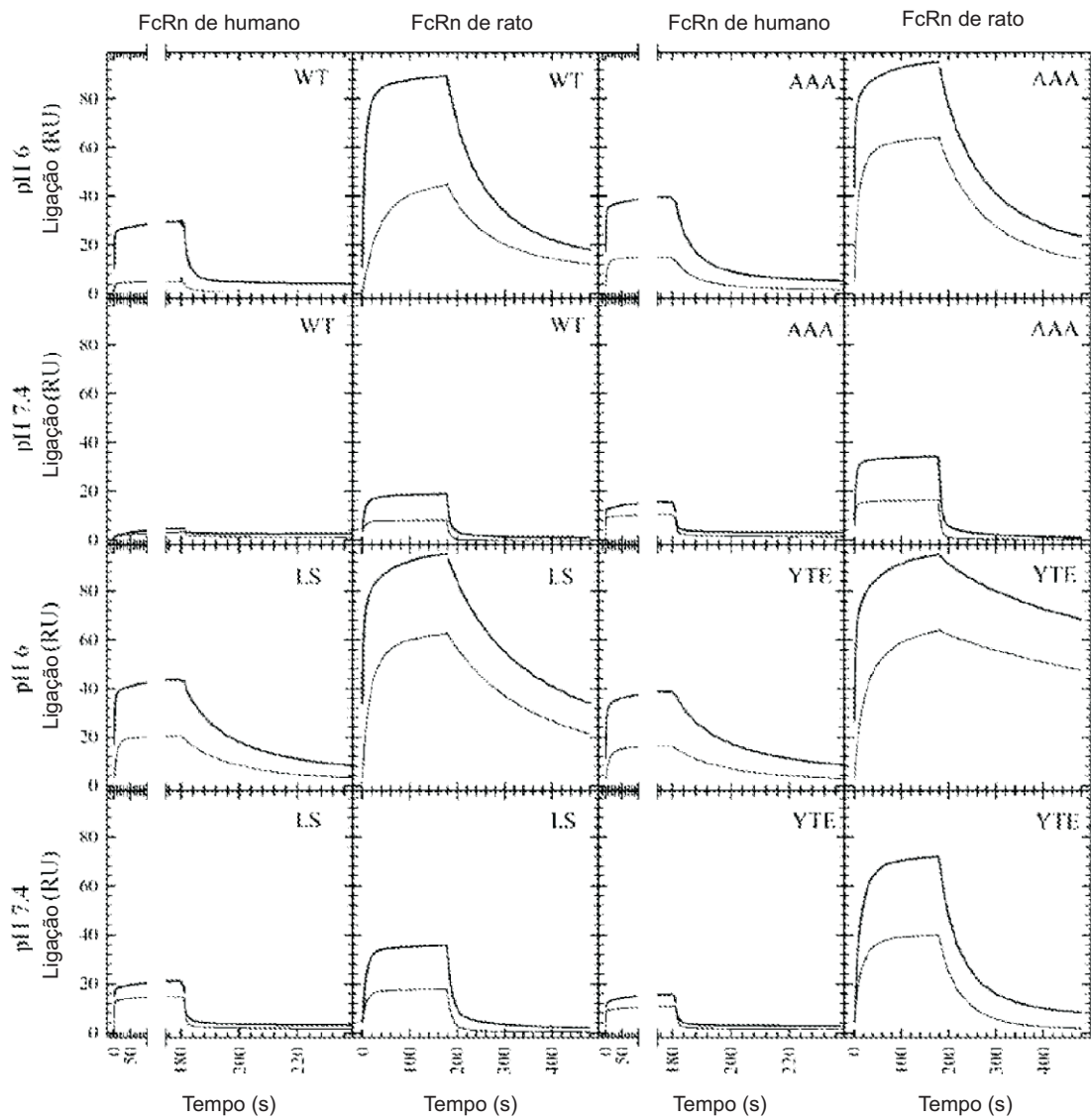


FIG. 4A

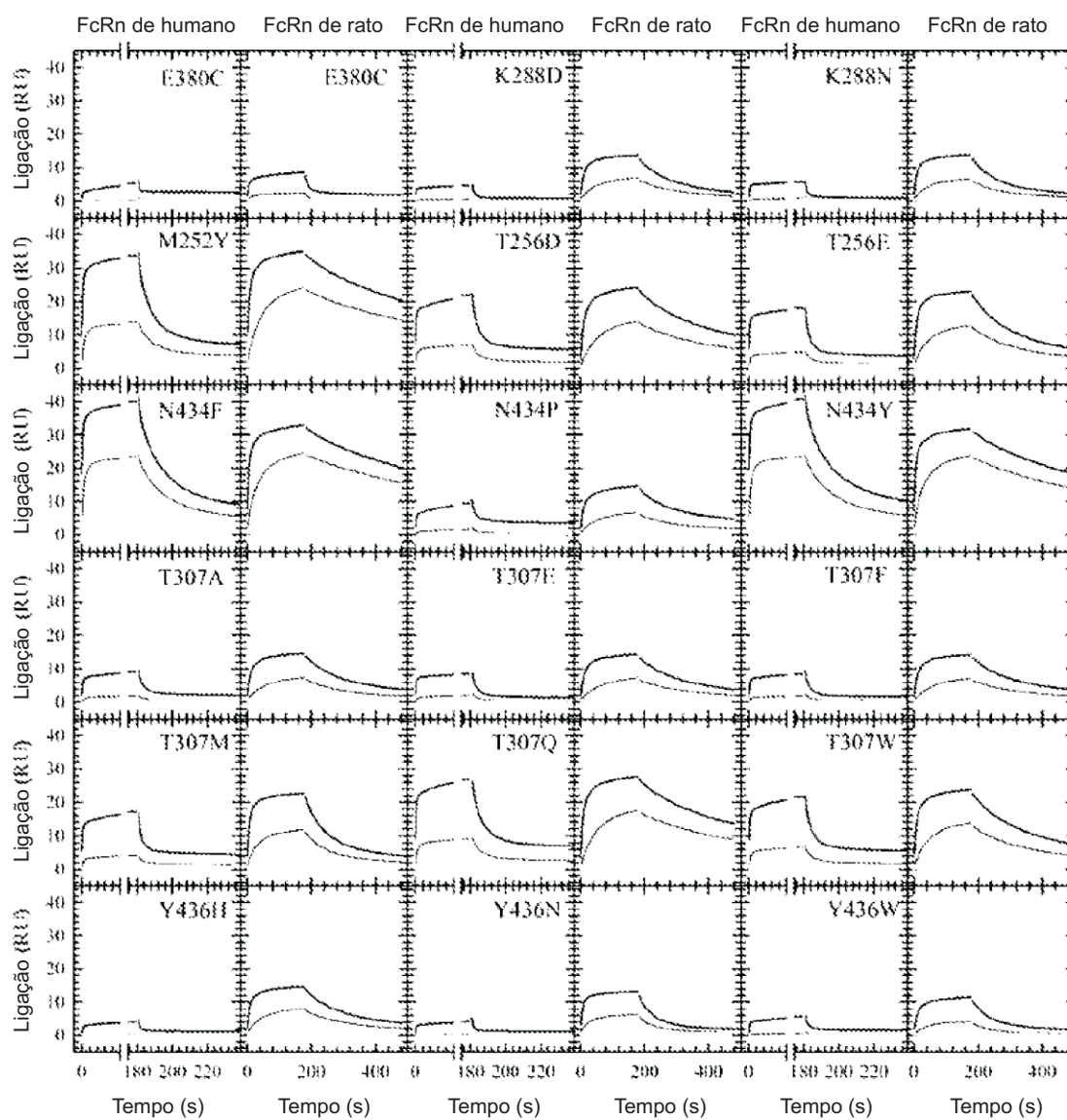


FIG. 4B

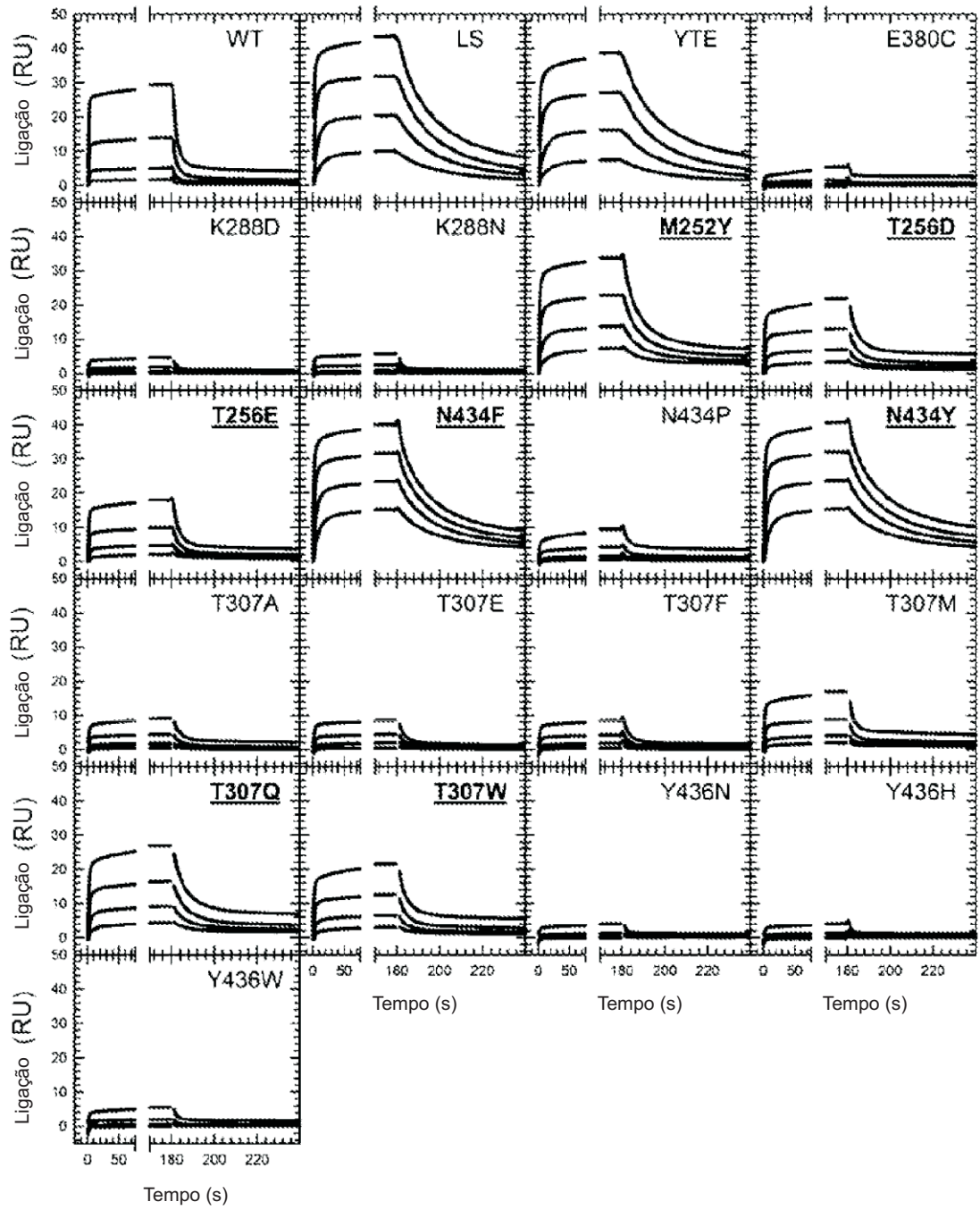


FIG. 5A

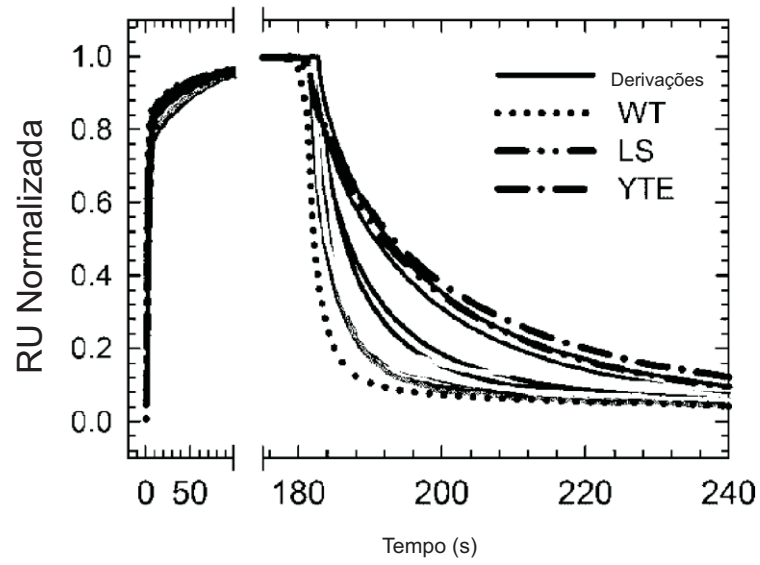


FIG. 5B

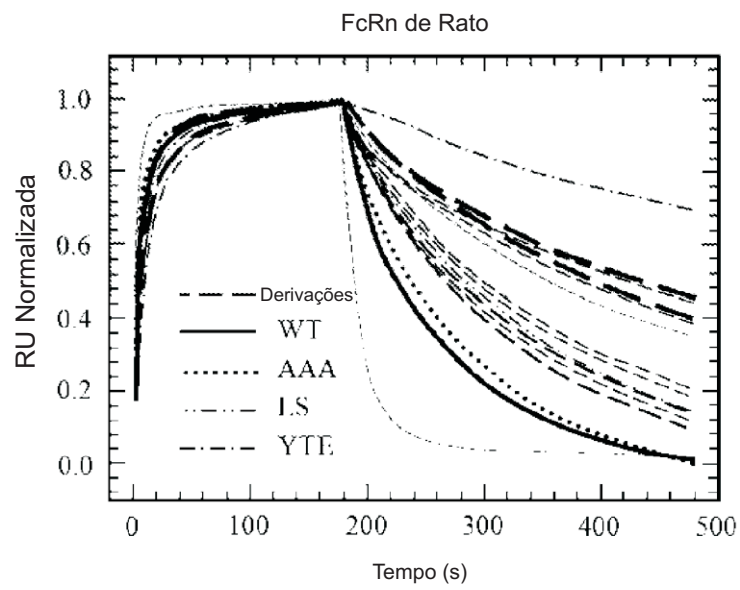


FIG. 5C

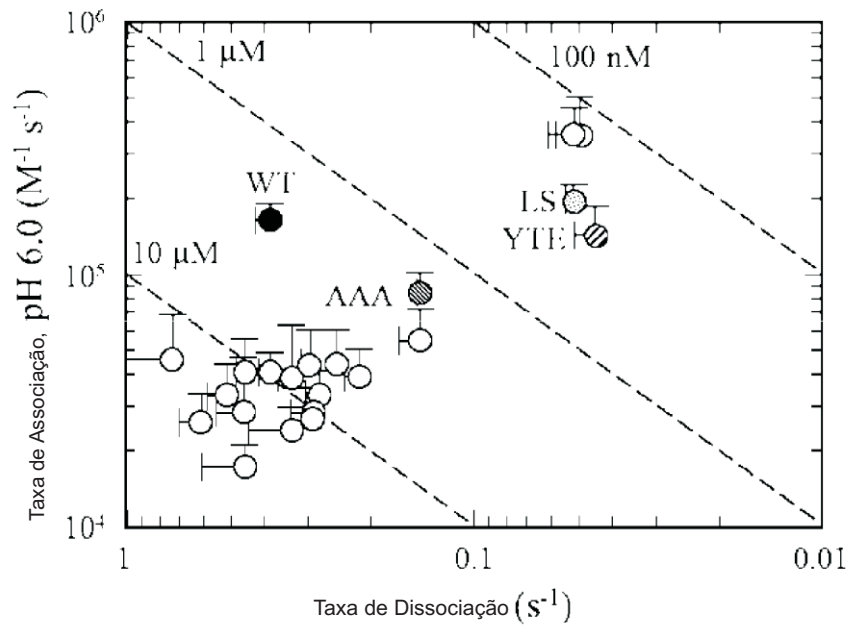


FIG. 5D

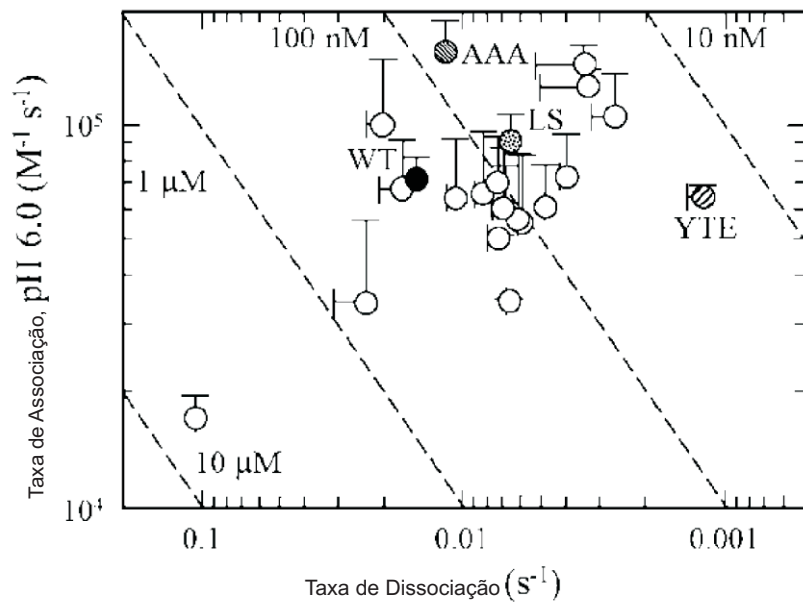


FIG. 6A

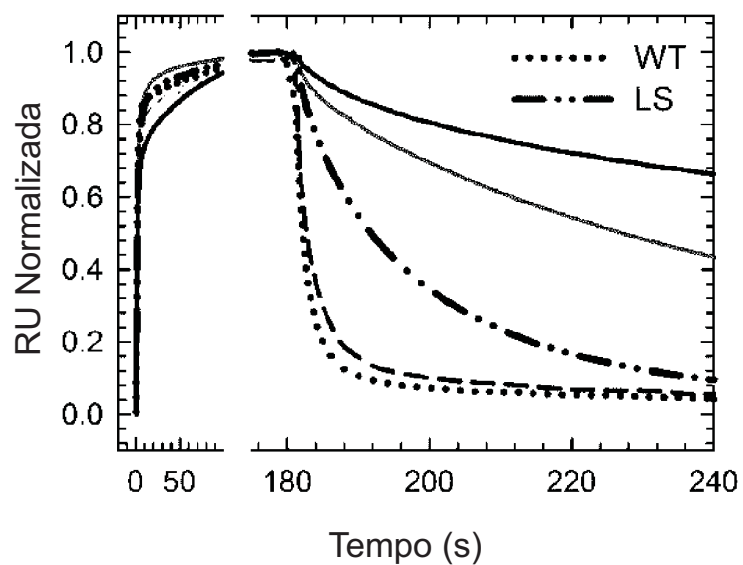


FIG. 6B

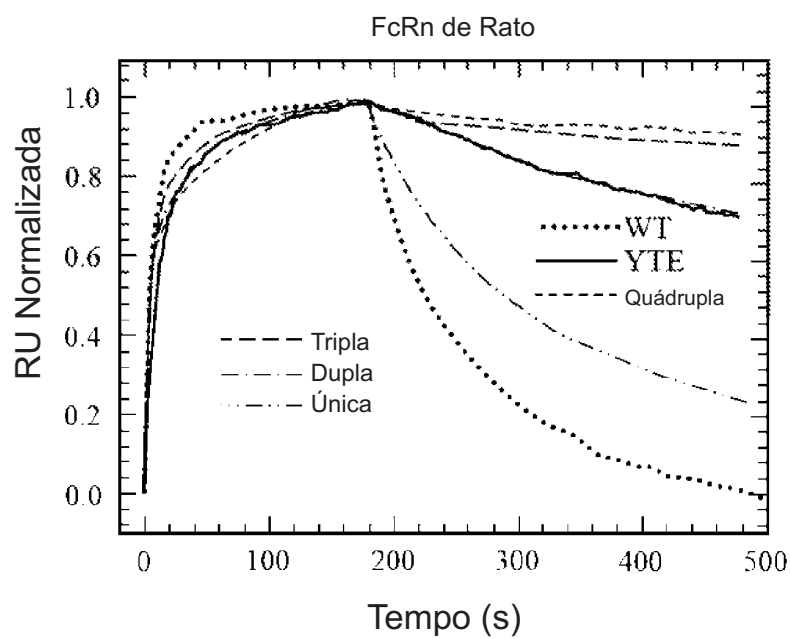


FIG. 6C

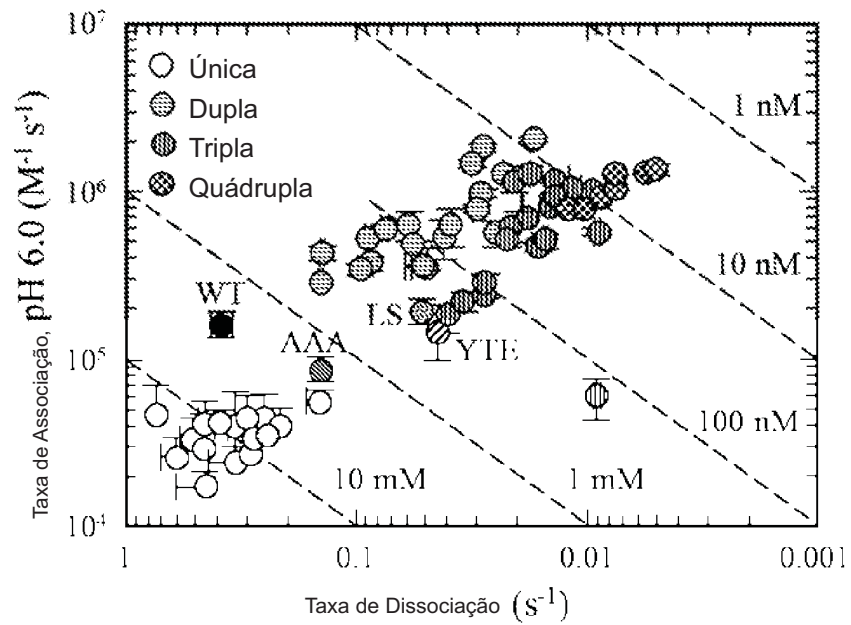


FIG. 6D

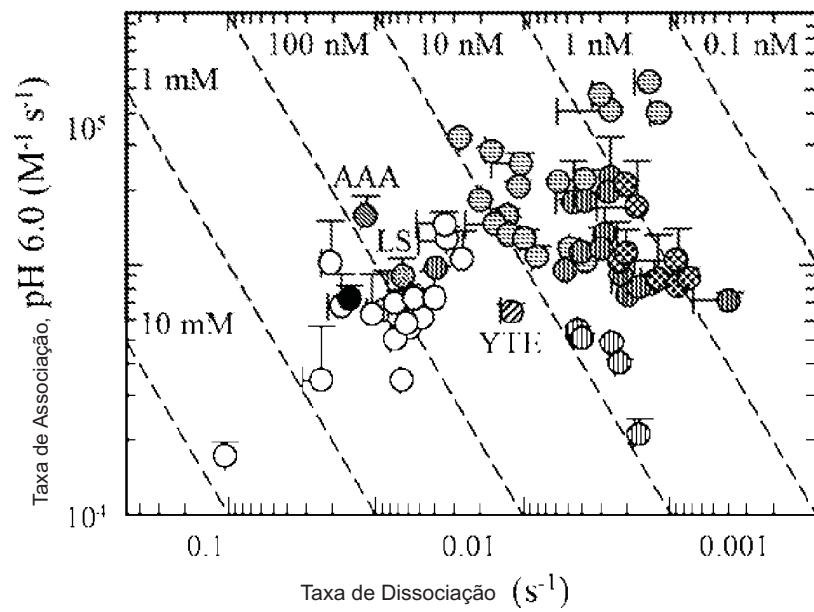


FIG. 7A

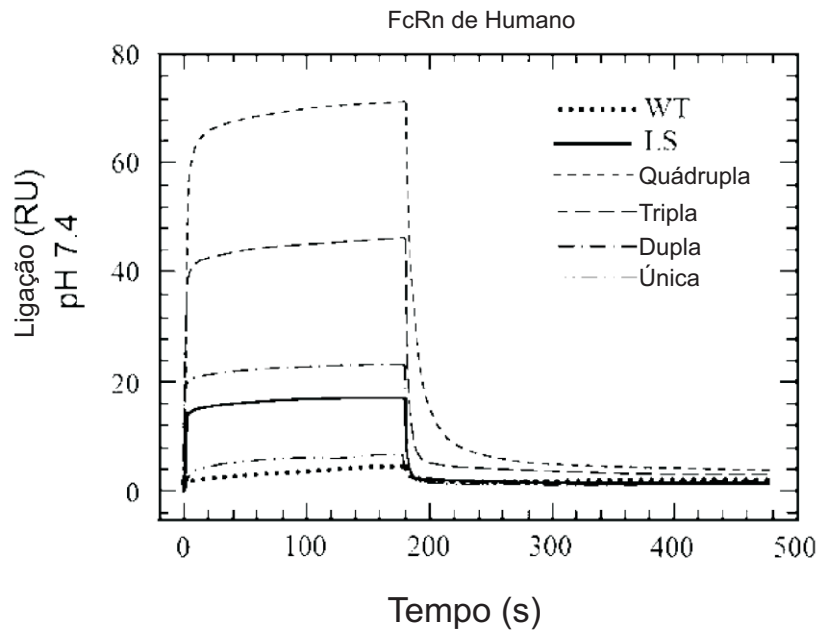


FIG. 7B

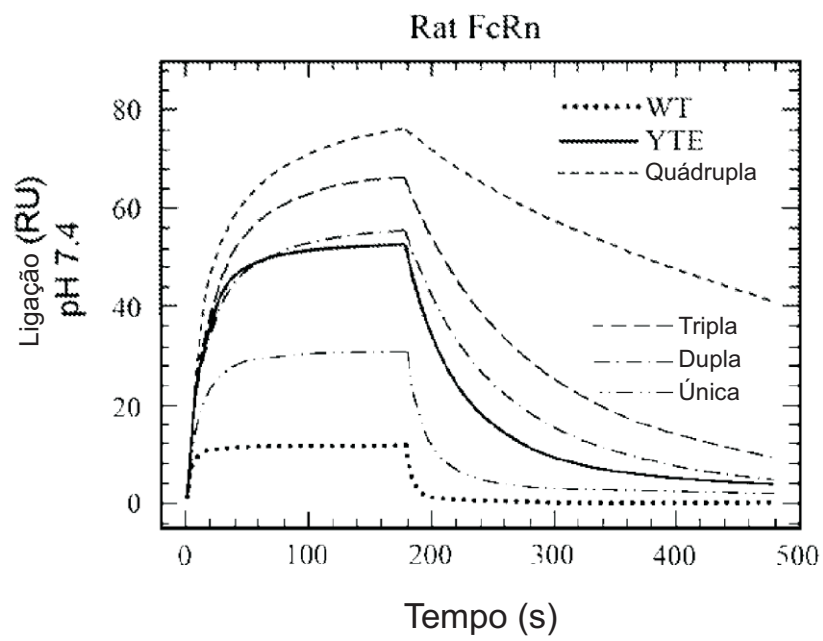


FIG. 7C

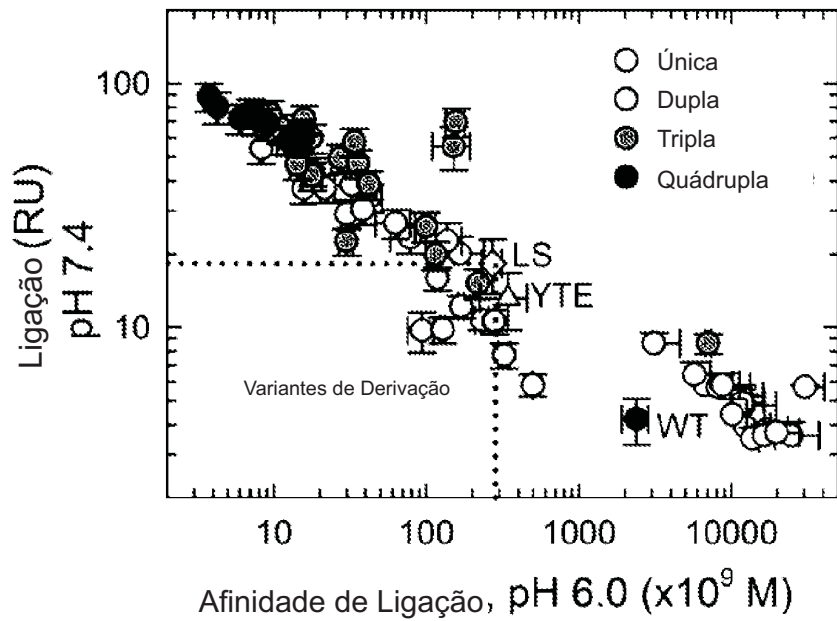


FIG. 7D

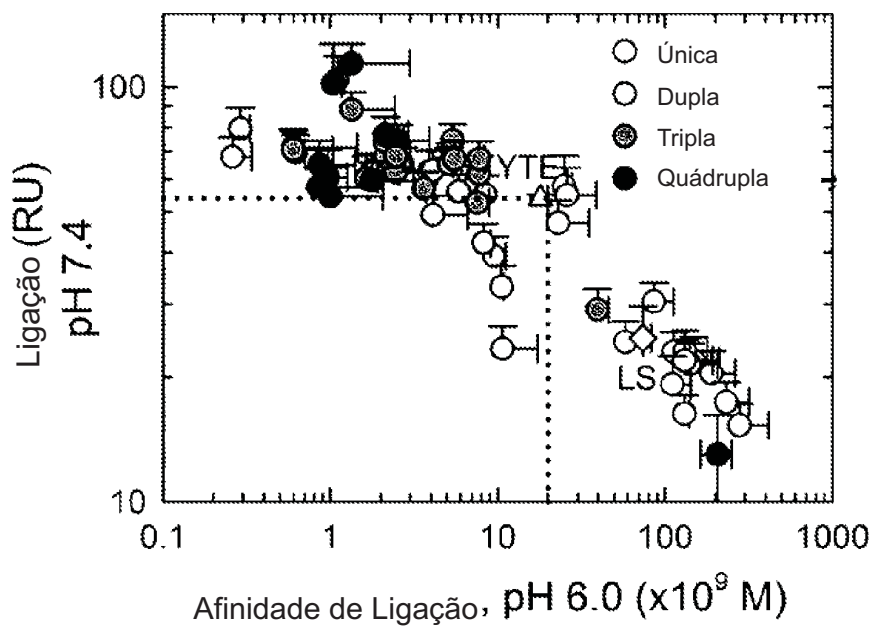


FIG. 8A

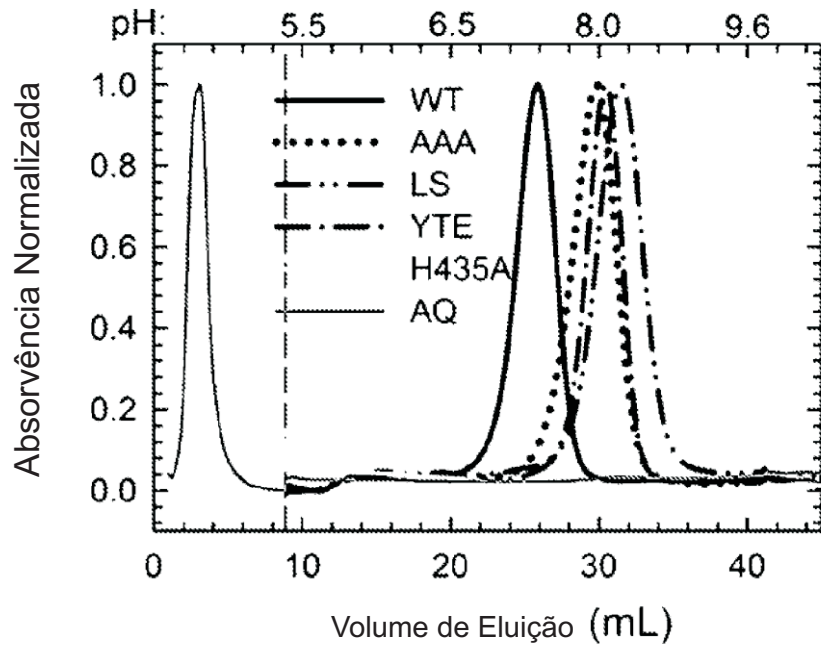


FIG. 8B

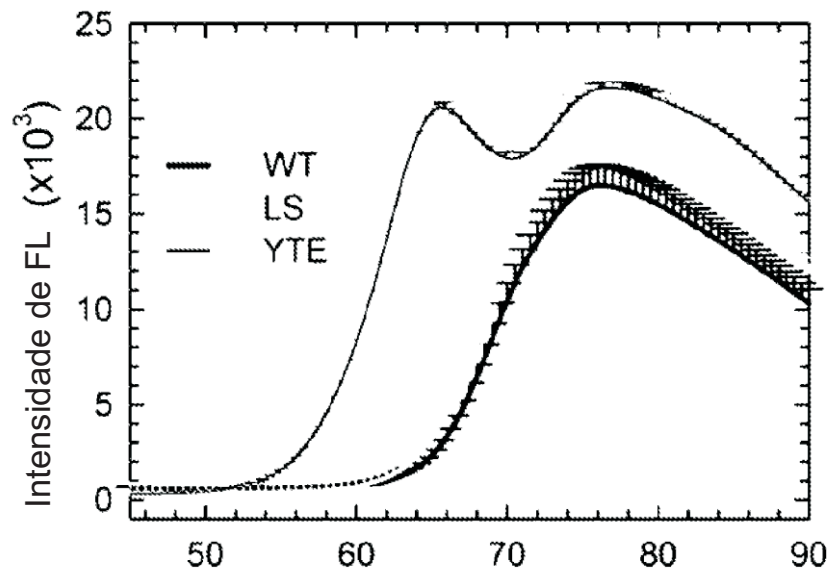


FIG. 8C

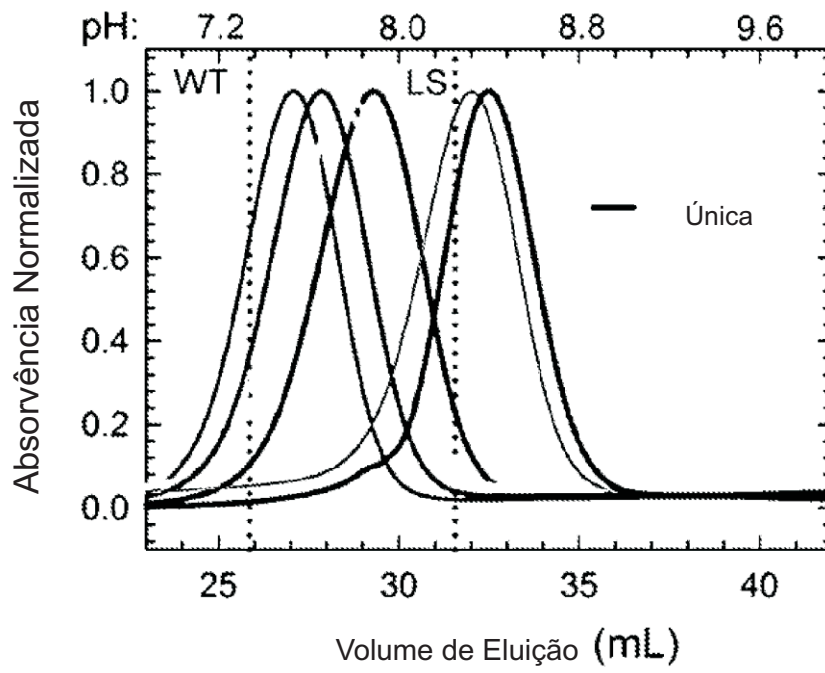


FIG. 9A

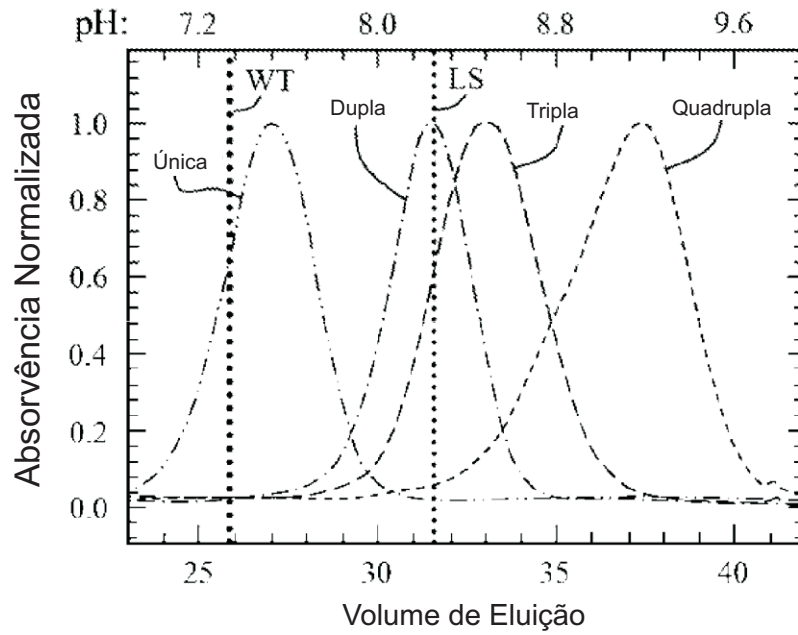


FIG. 9B

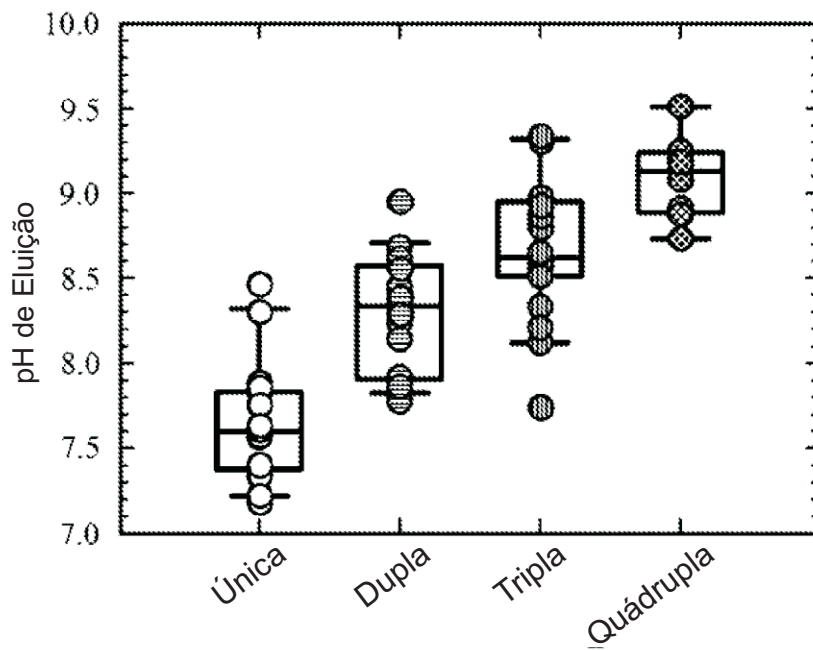


FIG. 9C

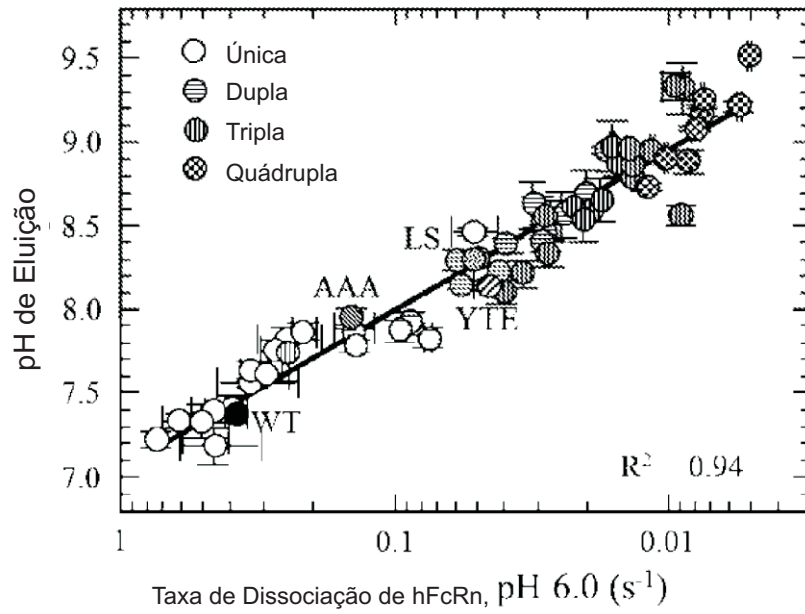


FIG. 9D

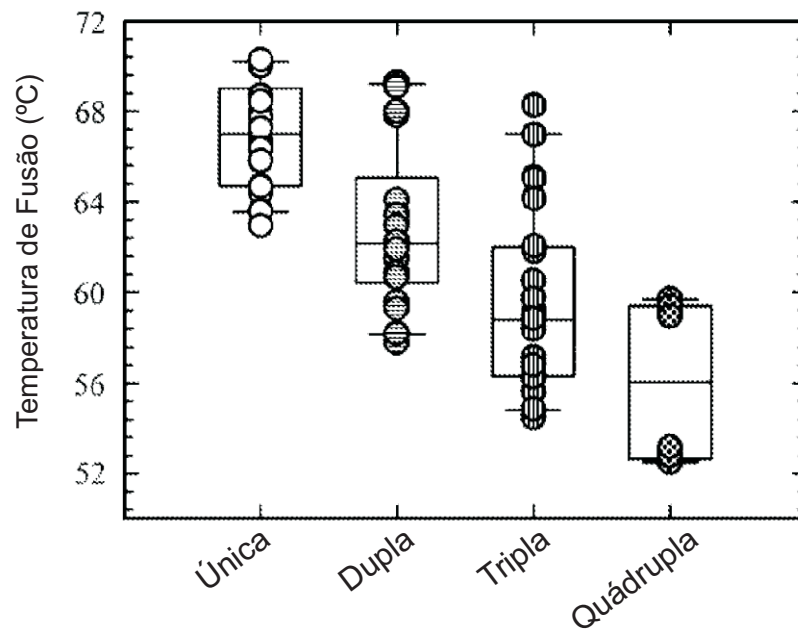


FIG. 10A

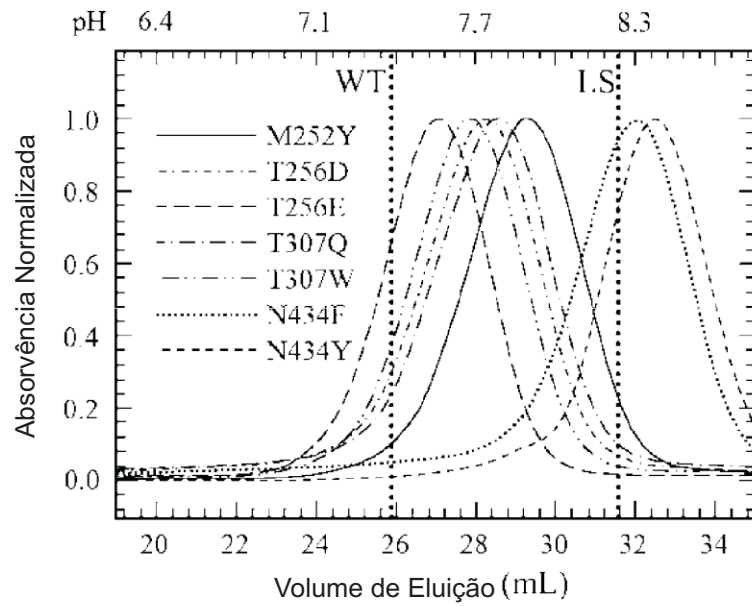


FIG. 10B

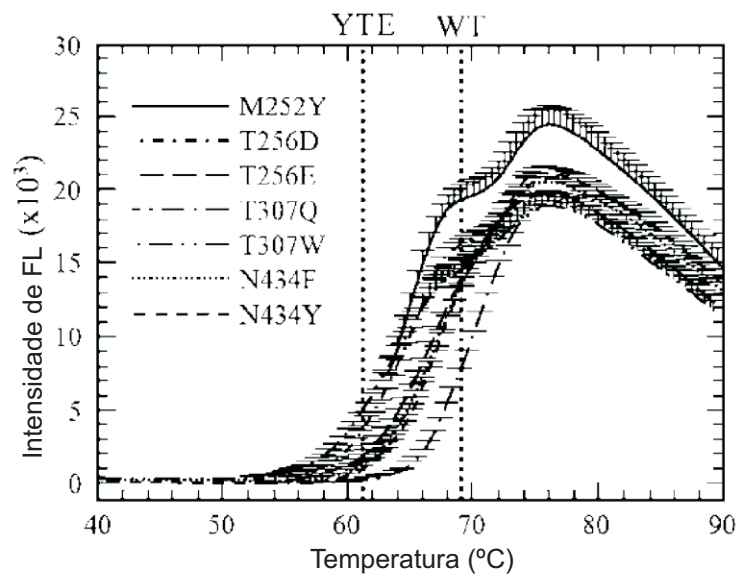


FIG. 11A

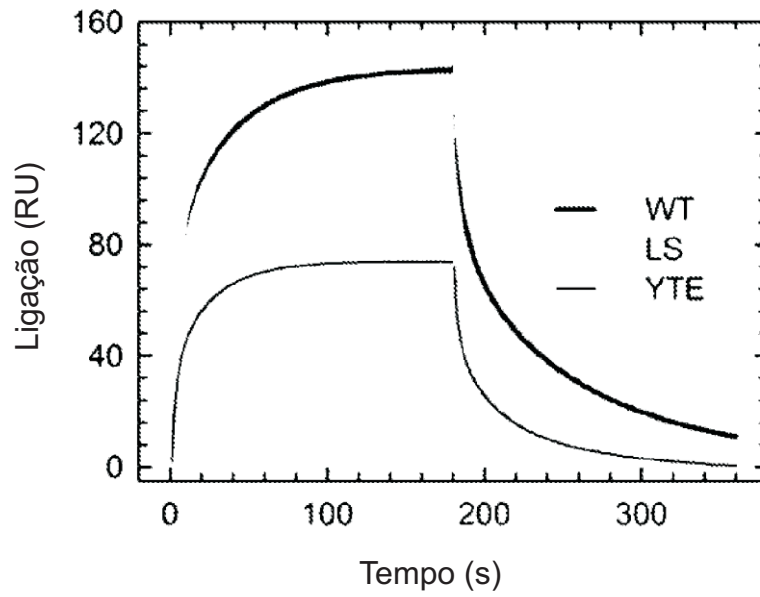


FIG. 11B

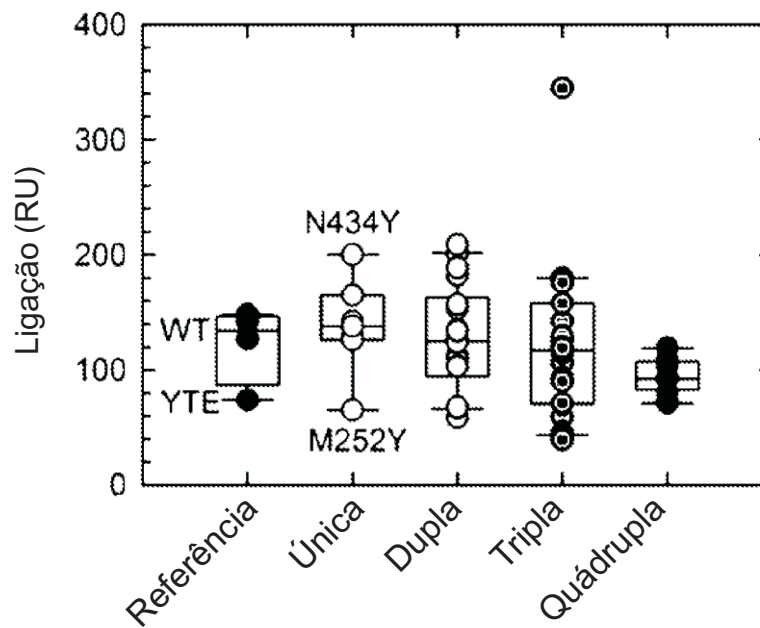


FIG. 11C

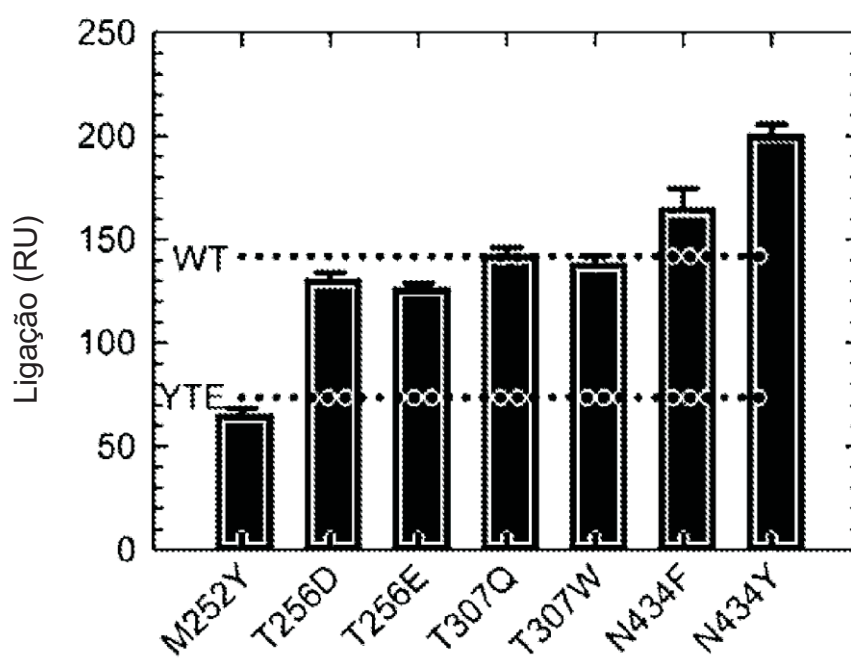


FIG. 12A

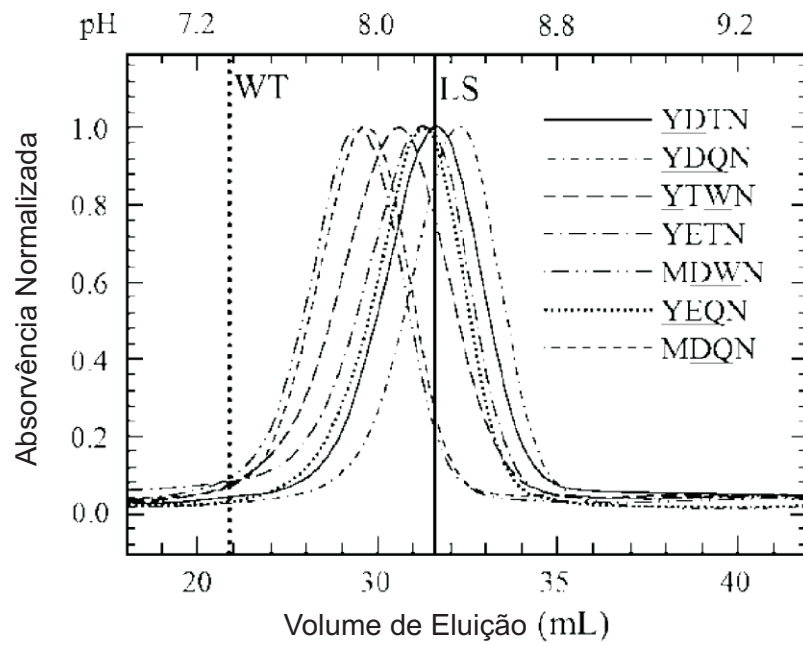


FIG. 12B

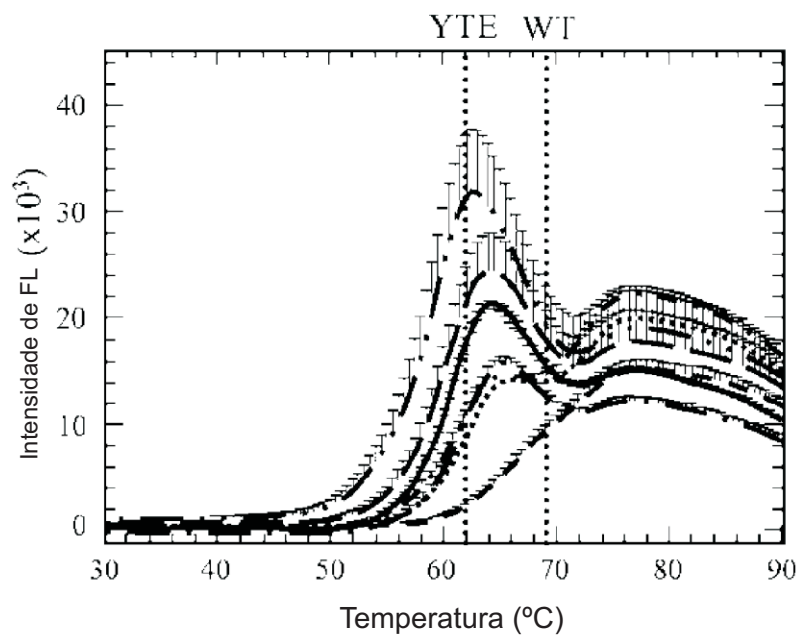


FIG. 12C

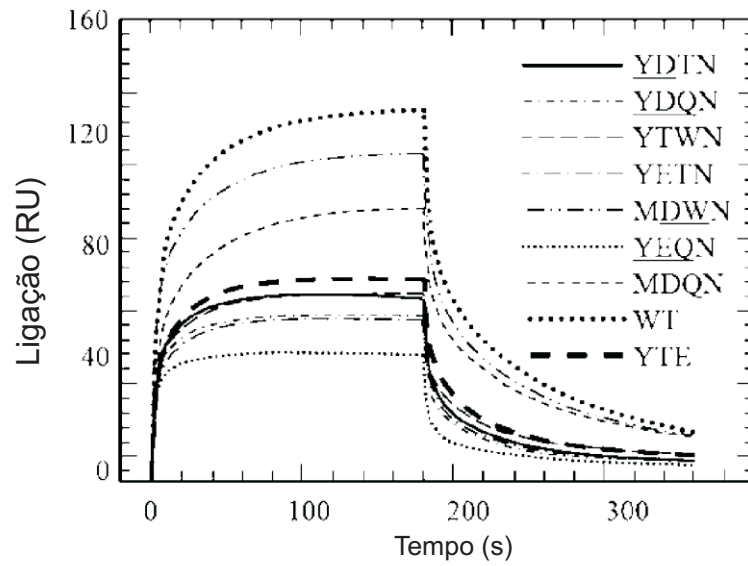


FIG. 12D

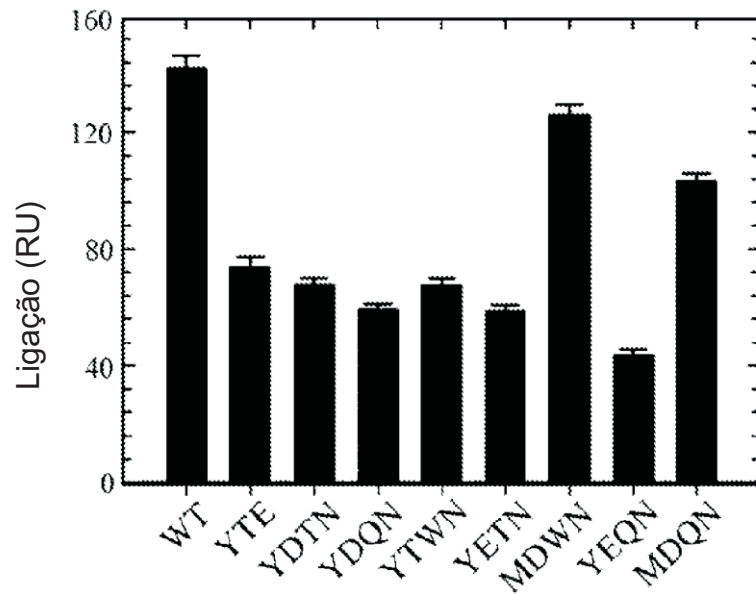


FIG. 12E

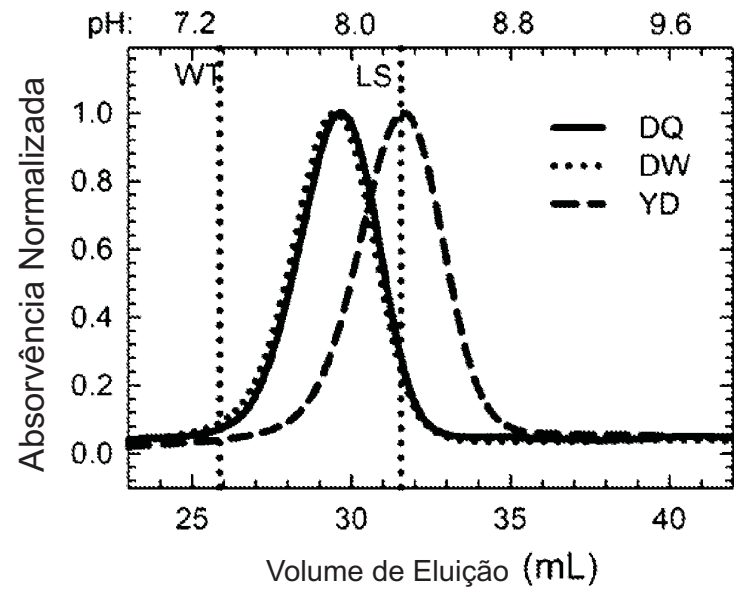


FIG. 12F

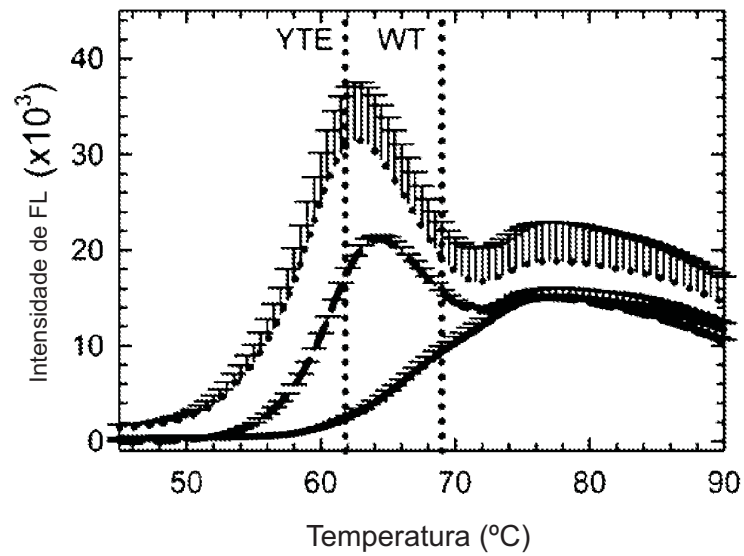


FIG. 12G

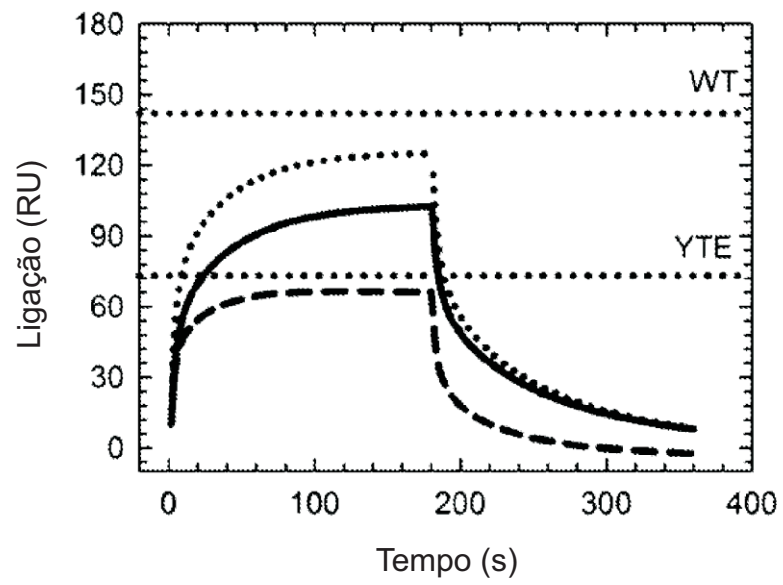


FIG. 12H

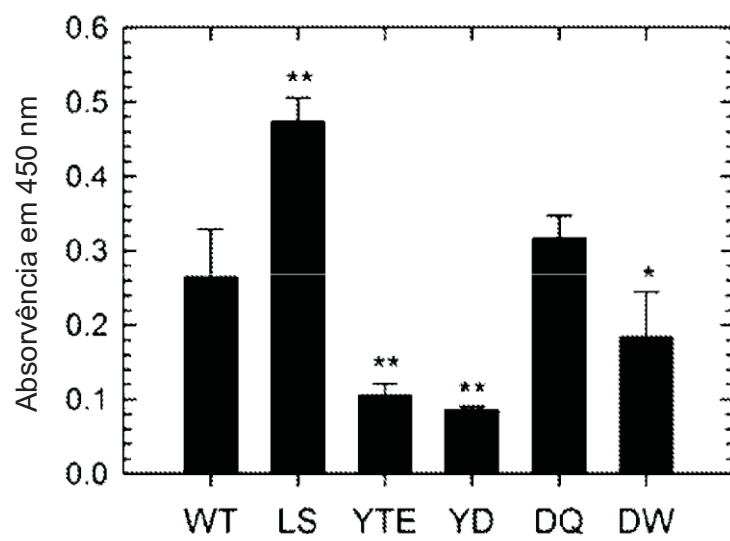


FIG. 13A

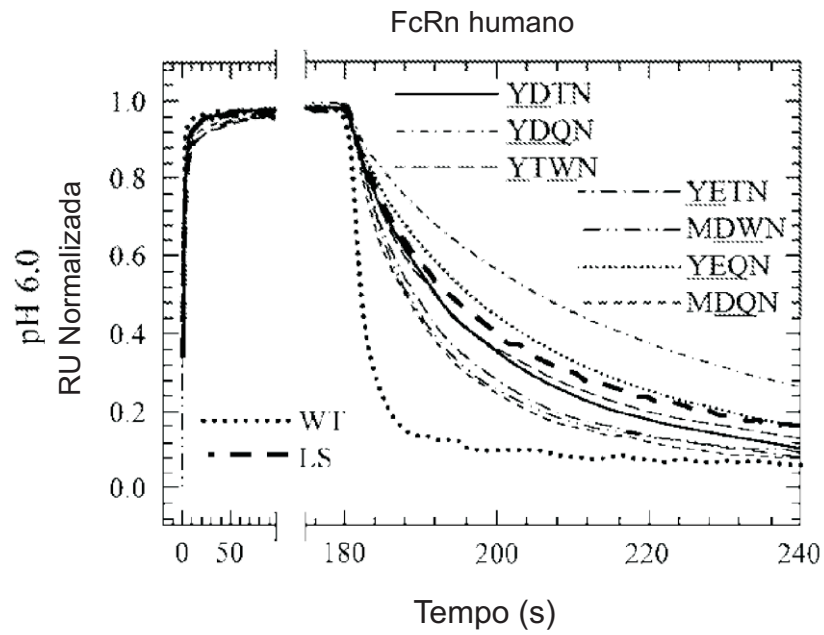


FIG. 13B

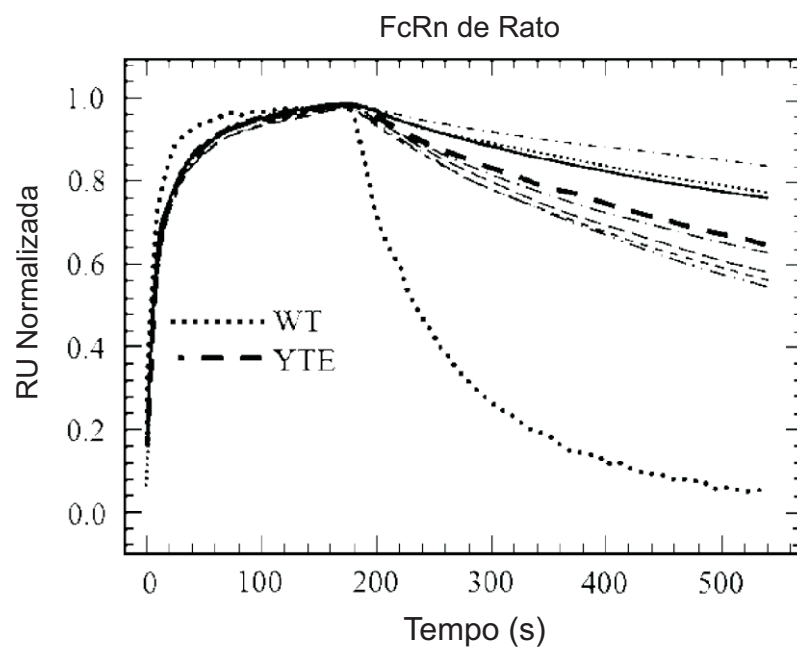


FIG. 13C

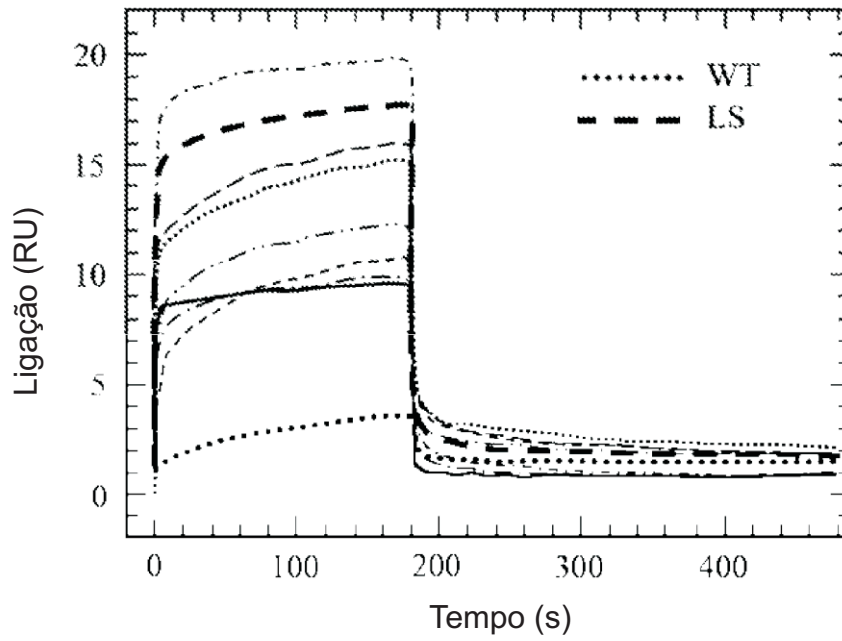


FIG. 13D

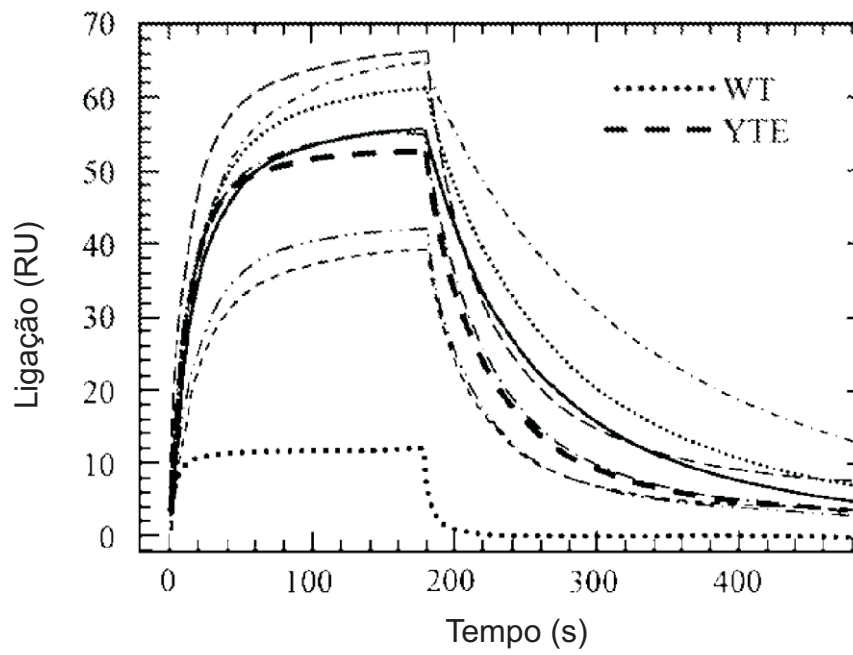


FIG. 14

Mutante	Posição										
	M252	I253	S254	T256	K288	T307	K322	E380	L432	N434	Y436
Mudança de Duplicação da Taxa de Dissociação de FcRn											
A		■				■					
C		■	■					■			
D	■	■	■	■	■					■	■
E	■	■	■	■		■		WT	■		■
F		■	■							■	
G	■	■									
H		■									■
I	■	WT									
K	■	■	■	■	WT		WT				■
L		■							WT		
M	WT					■					
N	■	■	■		■					WT	■
P	■	■	■	■			■			■	■
Q		■	■			■					
R		■	■								
S		■	WT								
T		■		WT		WT					
V											
W	■	■	■			■					■
Y	■	■	■							■	WT

FIG. 15A

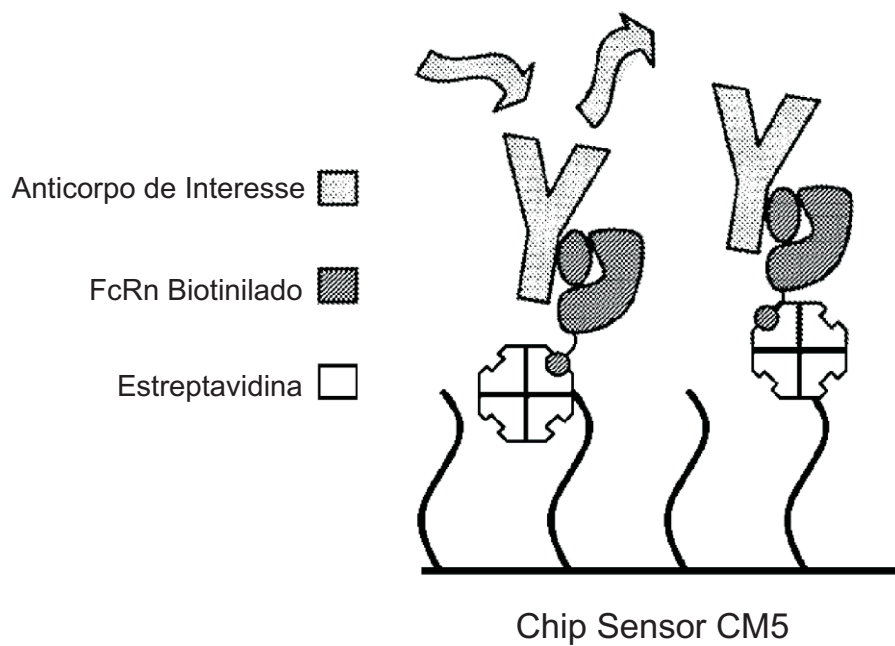


FIG. 15B

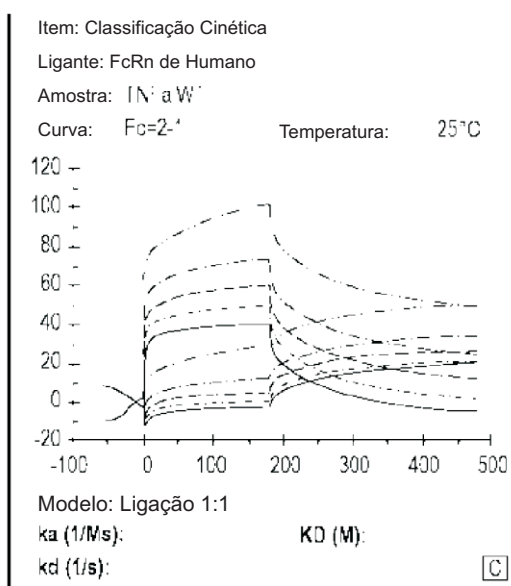


FIG. 15C

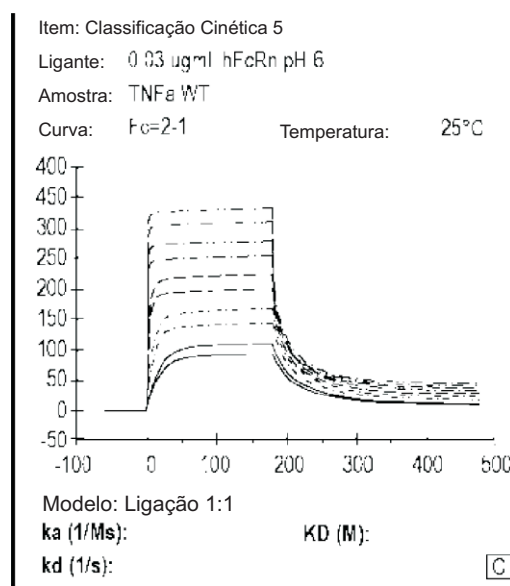


FIG. 16A

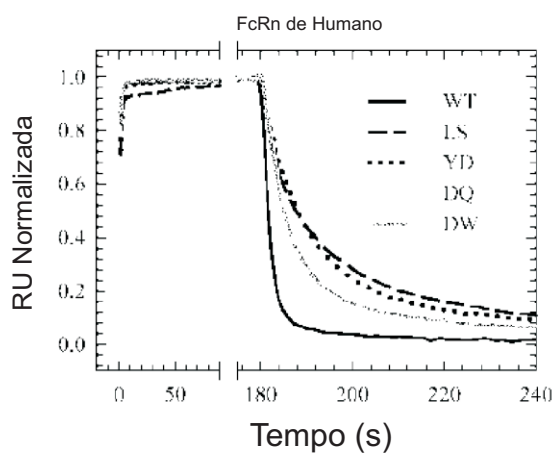


FIG. 16B

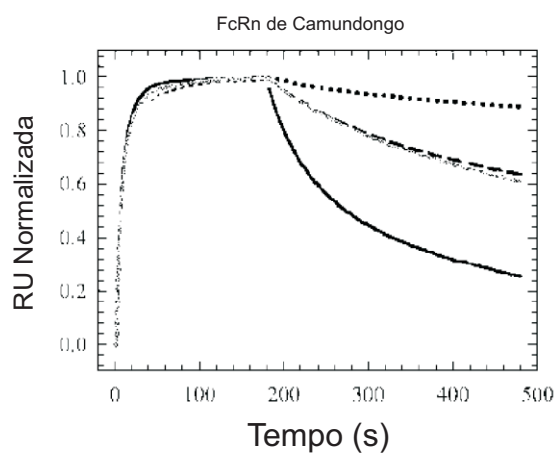


FIG. 17A

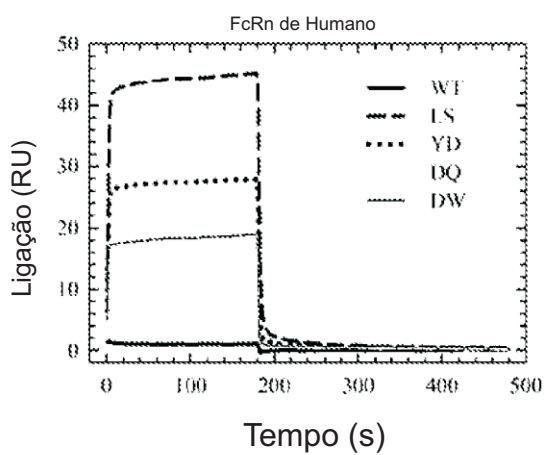


FIG. 17B

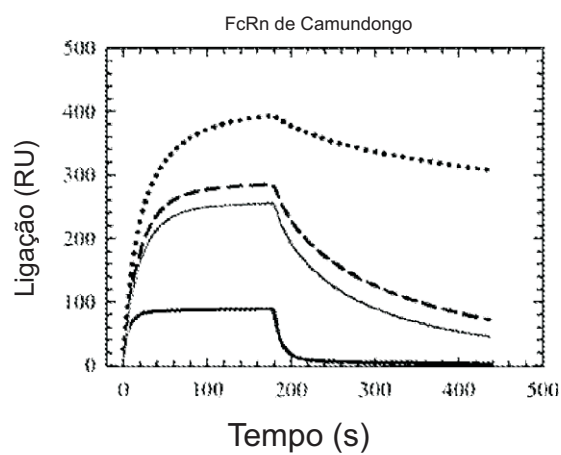


FIG. 18

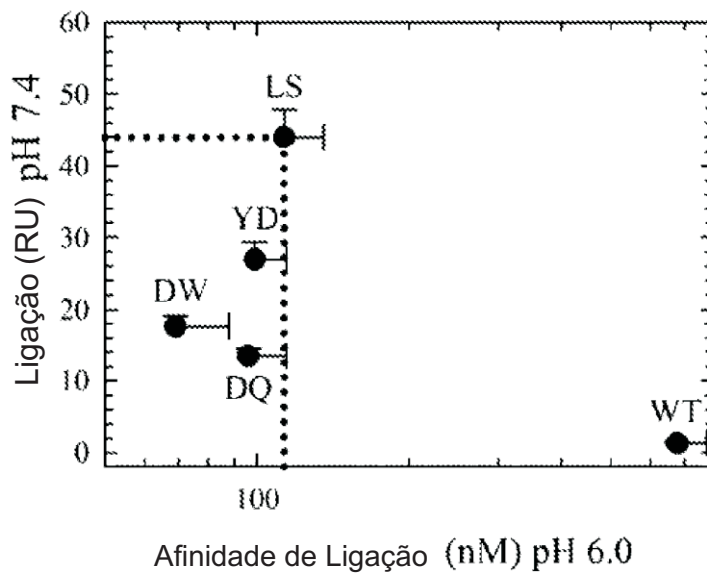
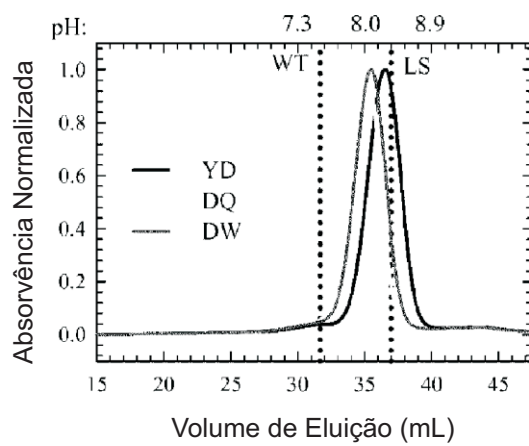
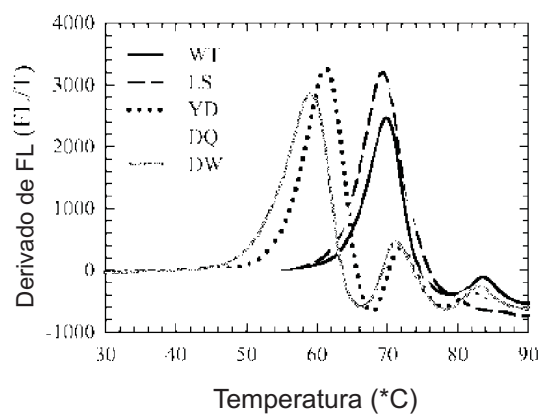


FIG. 19



Variante	Anticorpo 1	Anticorpo 2
WT	7.37	7.61
LS	8.29	8.32
YD	8.29	8.25
DQ	7.92	8.06
DW	7.92	8.11

FIG. 20



Variante	Anticorpo 1	Anticorpo 2
WT	69.0	69.3
LS	68.5	69.0
YD	59.6	60.5
DQ	67.9	69.3
DW	57.8	58.1

FIG. 21

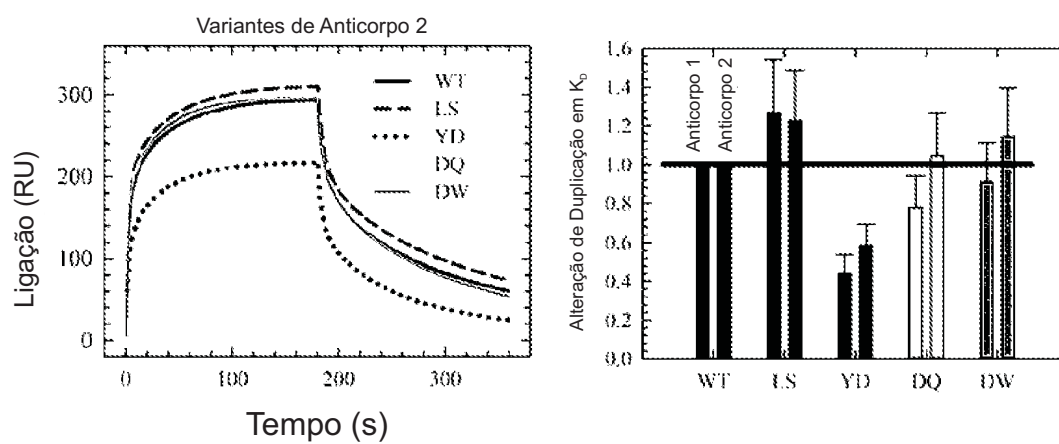


FIG. 22

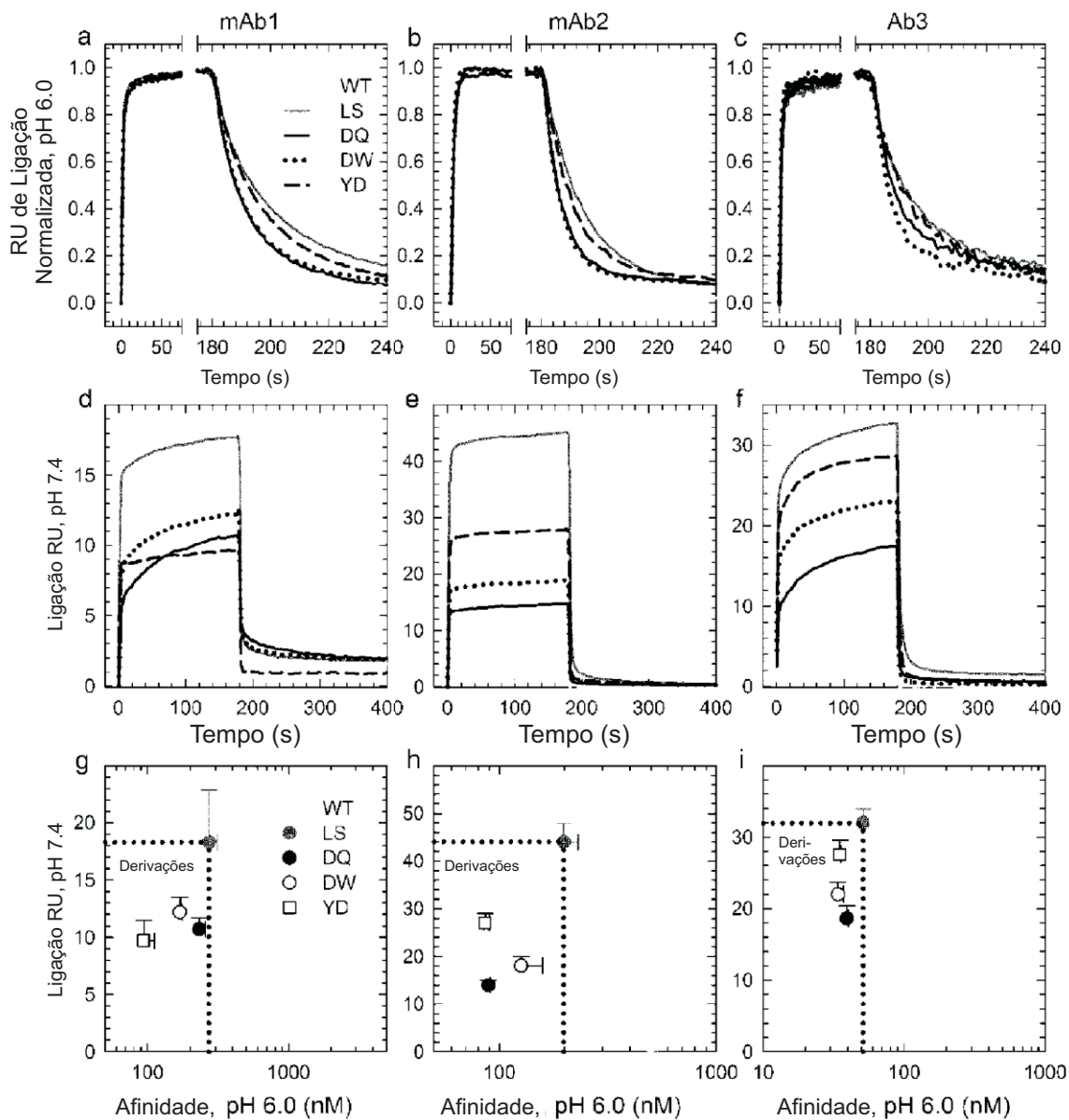


FIG. 23A

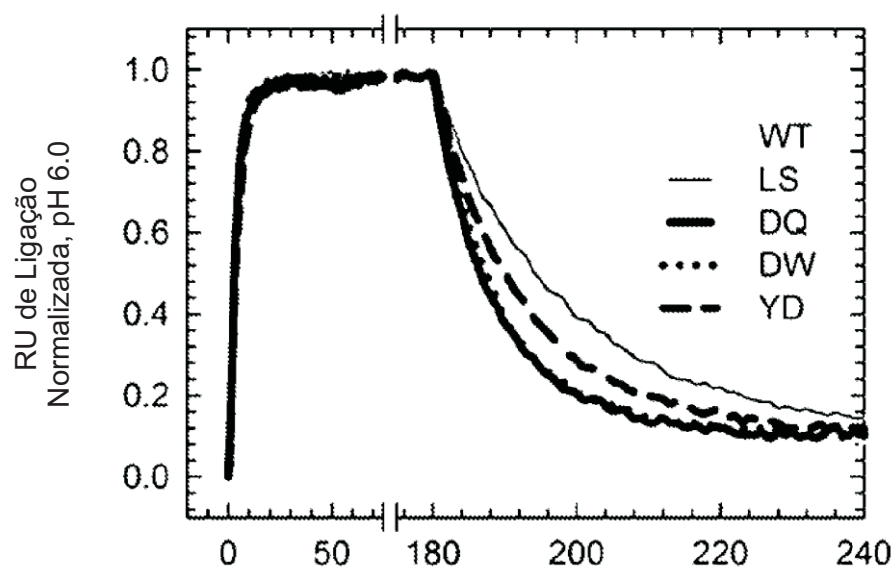


FIG. 23B

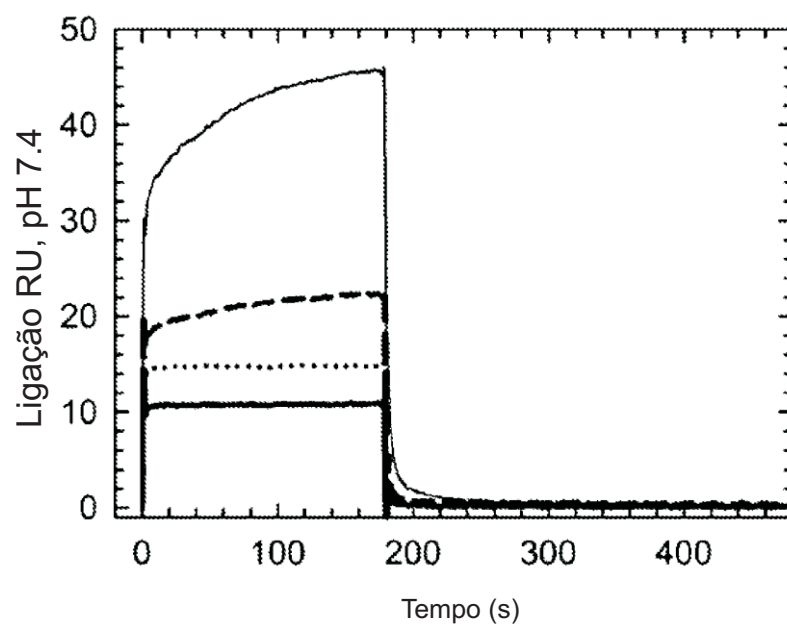


FIG. 23C

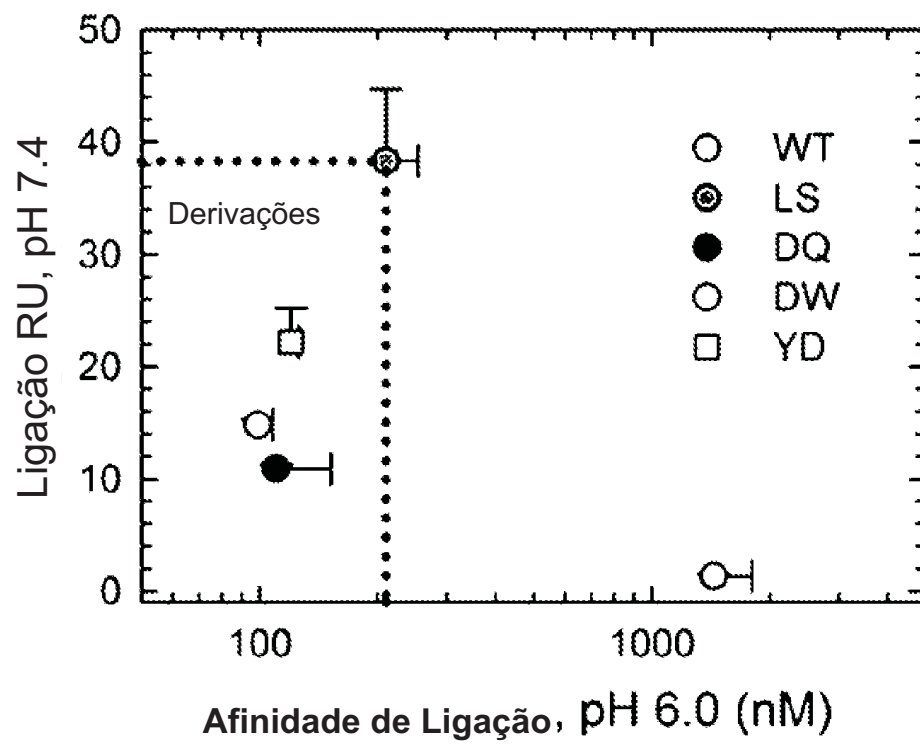


FIG. 24A

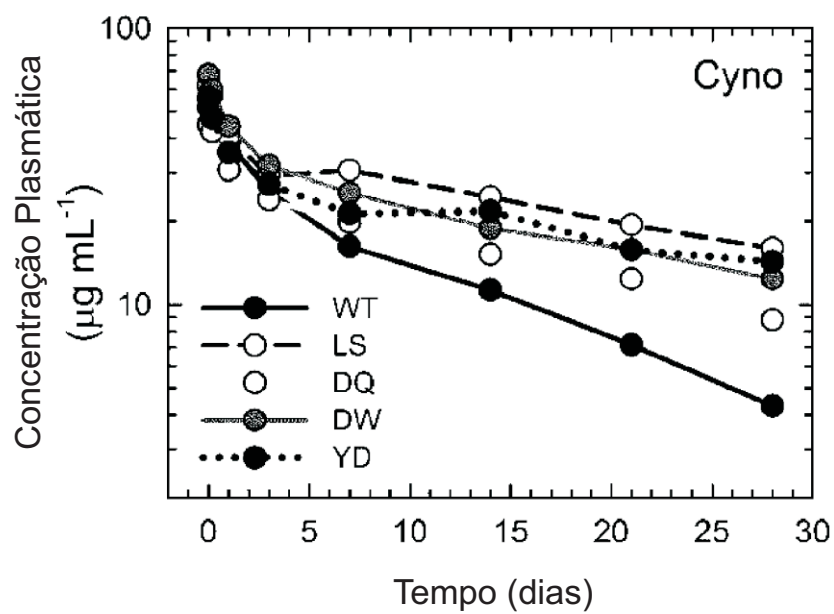


FIG. 24B

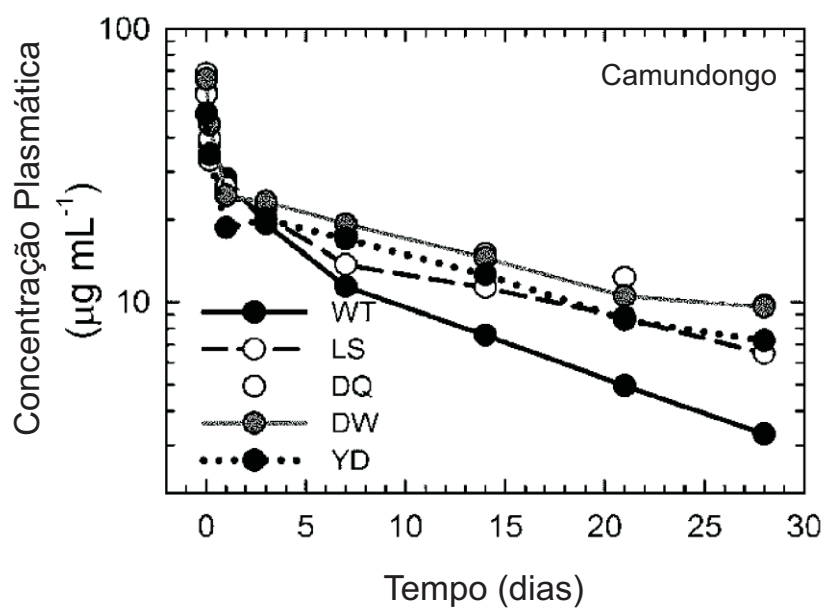


FIG. 25

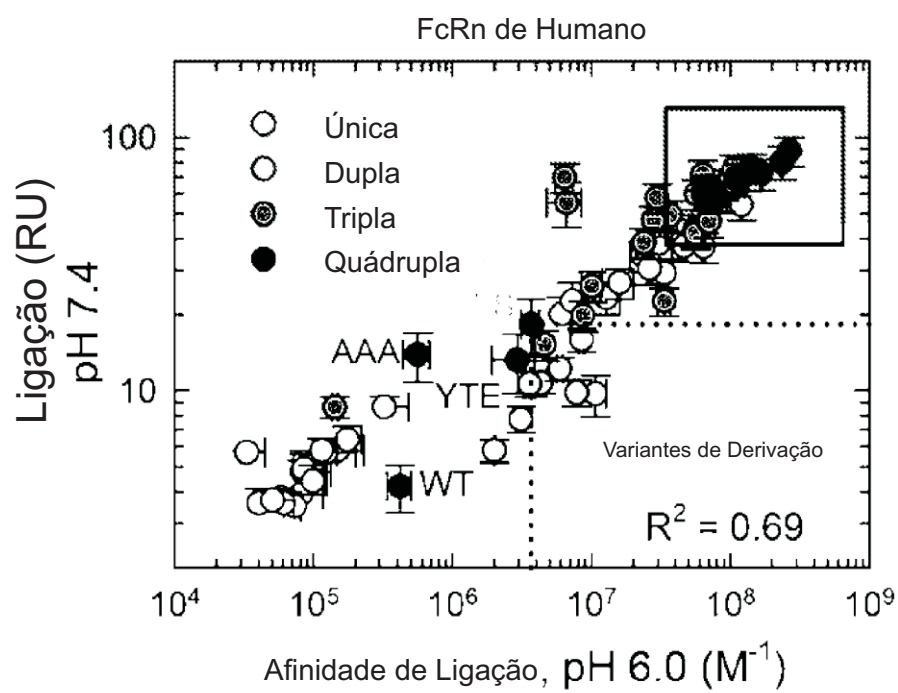


FIG. 26

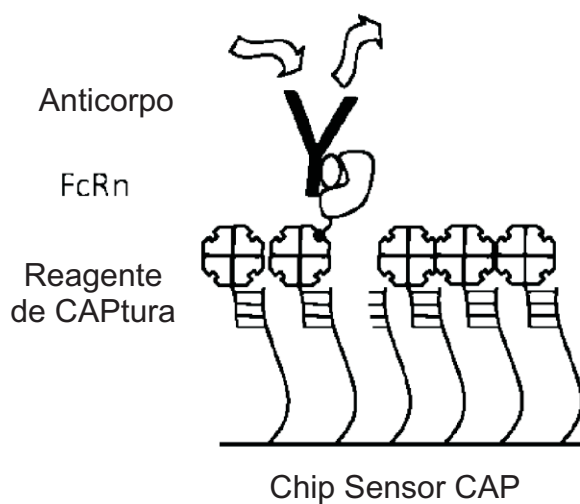


FIG. 27

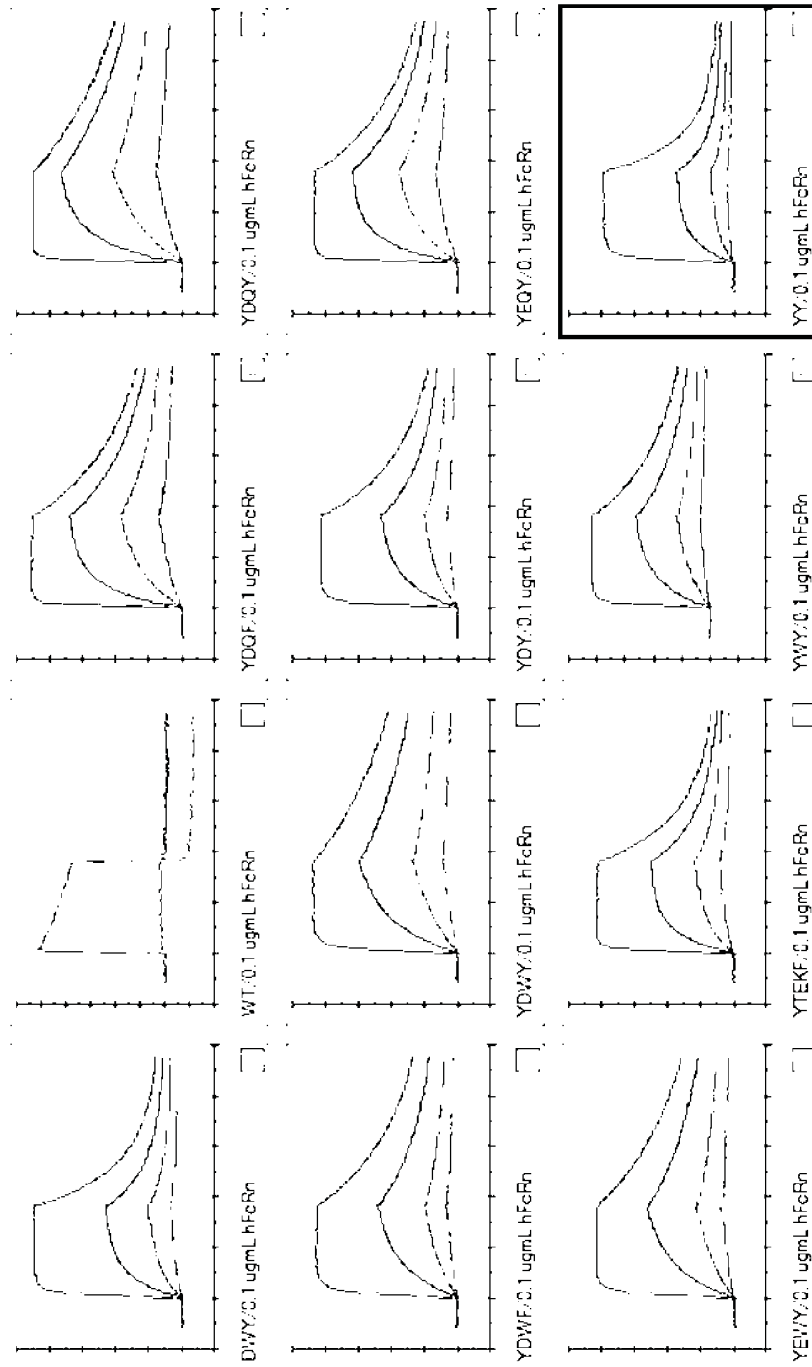


FIG. 28A

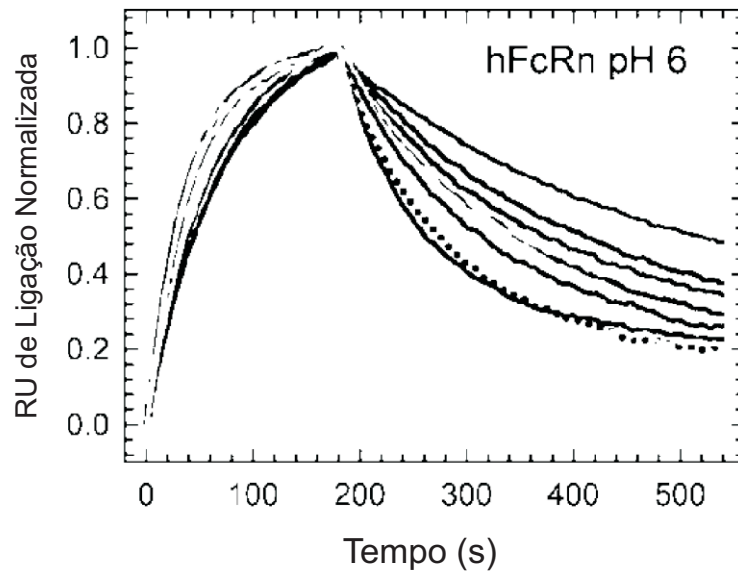


FIG. 28B

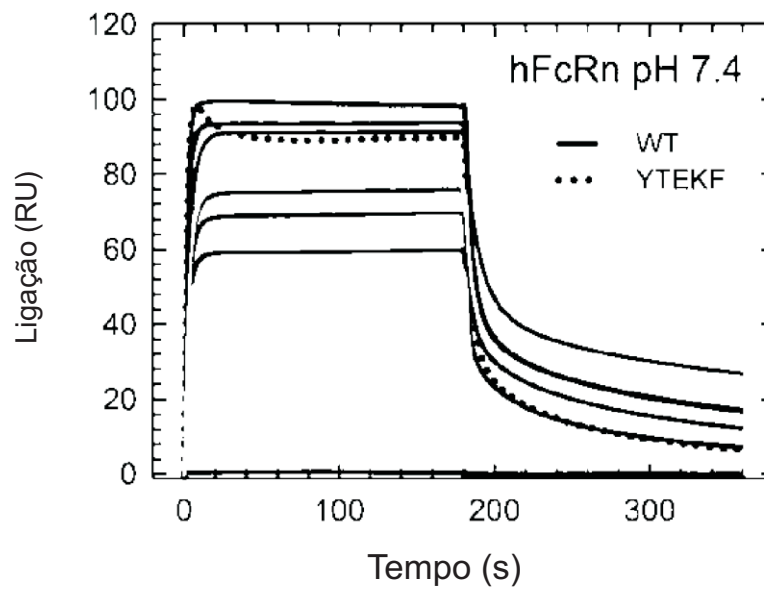
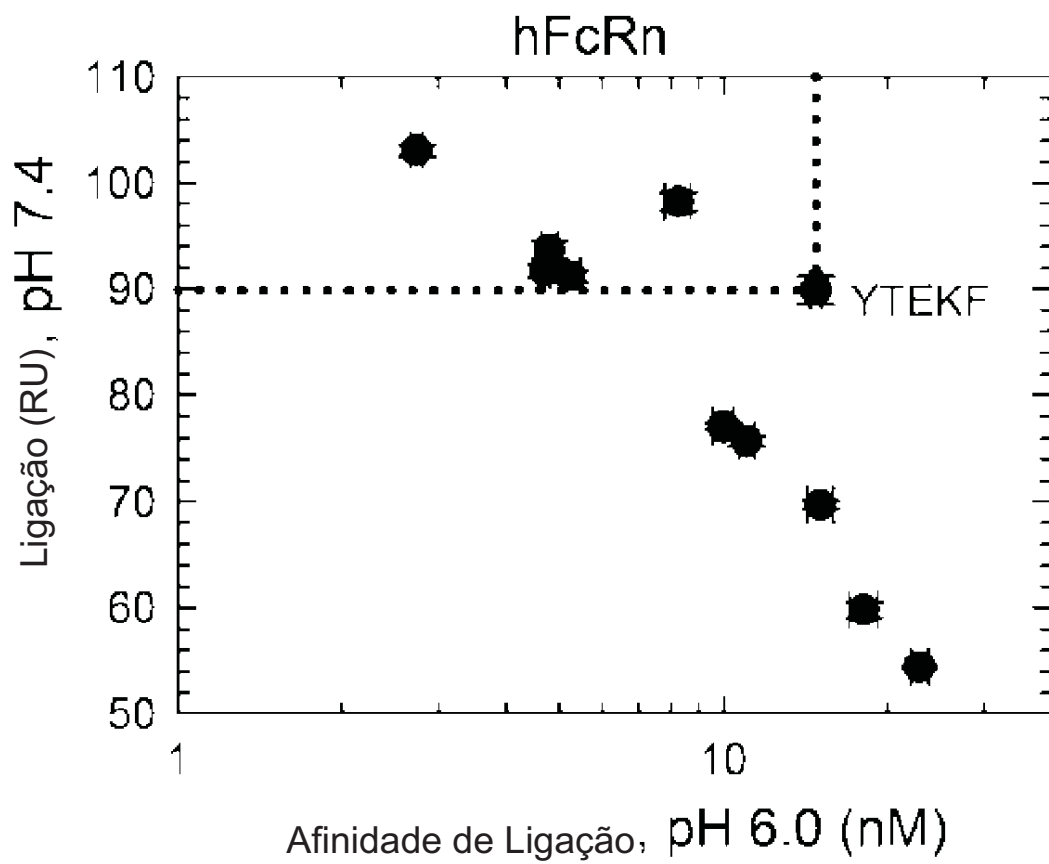


FIG. 29



RESUMO

Patente de Invenção: **“VARIANTES DE FC COM LIGAÇÃO REALIÇADA AO FCRN E MEIA-VIDA PROLONGADA”**.

A presente descrição fornece polipeptídeos de ligação (por exemplo, anticorpos e imunoadesinas) compreendendo um domínio Fc modificado. A presente descrição também fornece ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de ligação, vetores de expressão recombinantes e células hospedeiras para a produção desses polipeptídeos de ligação. Métodos de uso dos polipeptídeos de ligação aqui descritos para tratar a doença são também fornecidos.