

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 506**

51 Int. Cl.:

A61P 11/00	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2004 PCT/US2004/000643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2004 WO04063351**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2004 E 04701279 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 1587540**

54 Título: **Identificación y modificación de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

09.01.2003 US 439498 P
19.03.2003 US 456041 P
23.10.2003 US 514549 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

STAVENHAGEN, JEFFREY y
VIJH, SUJATA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 897 506 T3

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

DESCRIPCIÓN

Identificación y modificación de anticuerpos con regiones Fc variantes y métodos de utilización de los mismos

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a moléculas, particularmente polipéptidos, más particularmente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Las moléculas de la invención son particularmente
10 útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en el que se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa y para mejorar la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC.

2. Antecedentes de la invención

2.1 Receptores Fc y sus funciones en el sistema inmunitario

15 La interacción de complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunológico da como resultado una amplia gama de respuestas, que van desde funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis hasta señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunes a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunes
20 resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores Fc. Los receptores Fc comparten dominios de unión a ligandos relacionados estructuralmente que supuestamente median la señalización intracelular.

Los receptores Fc, miembros de la superfamilia de proteínas del gen de inmunoglobulina, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la porción Fc de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce
25 inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor Fc. Los receptores Fc se definen por su especificidad por los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se denominan FcγR, para IgE como FεR y para IgA como FcaR. Diferentes células accesorias portan receptores Fc para anticuerpos de diferentes isotipos, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias participarán en una respuesta dada (revisado por Ravetch JV et al. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber JS et al. 2001 Microbes
30 and Infection, 3: 131-139; Billadeau DD et al. 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2 (109): 161-1681; Ravetch JV et al. 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch JV et al., 2001 Annu. Rev. Immunol. 19: 275-90; Ravetch JV 1994, Cell, 78 (4): 553-60). Los diferentes receptores Fc, las células que los expresan y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptado de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ª ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York). Shields et al., en "High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR" (Journal Of
35 Biological Chemistry, 276 (9), 6591 -6604, 2001), describió que los receptores Fc de inmunoglobulina G (IgG) juegan un papel crítico en la unión de respuestas inmunes mediadas por anticuerpos IgG con funciones efectoras celulares, determinó un mapa de alta resolución del sitio de unión en IgG1 humana para receptores FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcRn, y describieron variantes seleccionadas de IgG1.

40 Receptores Fcγ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un dominio único que atraviesa la membrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Hay tres FcγR conocidos, denominados FcγRI (CD64), FcγRII(CD32) y FcγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la amplia homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común quizás por
45 duplicación de genes.

FcγRII(CD32)

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

Las distintas diferencias dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas
55 funcionalmente heterogéneas a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la

señalización intracelular que conduce a la activación celular, como la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, Inhibiendo la activación de las células B.

Señalización a través de los FcγR

5 Tanto las señales de activación como las inhibitoras se transducen a través de los FcγR después de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmica del receptor llamados motivos de activación basados en la tirosina de inmunorreceptores (ITAM) o motivos inhibitoras basados en la tirosina de inmunorreceptores (ITIMS) explican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB.

10 Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante inmunocomplejos o entrecruzamiento de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI3K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

15 El gen de FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico al FcγRIIA y se une a los complejos de IgG de manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibitora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se une junto con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 del polifosfato inositol 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando así la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Por tanto, el entrecruzamiento de FcγRIIB amortigua la respuesta de activación a la ligación de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. Por lo tanto, se interrumpe la activación de las células B, la proliferación de las células B y la secreción de anticuerpos.

Tabla 1: Receptores para las regiones Fc de los isotipos de inmunoglobulina

Receptor	Fc γ RI (CD64)	Fc γ RII-A (CD32)	Fc γ RII-B2 (CD32)	Fc γ RII-B1 (CD32)	Fc γ RIII (CD16)	Fc ϵ RI	Fc α RI (CD89)
De unión	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2 x 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 5 x 10 ⁵ M ⁻¹	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹
Tipo célula	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Células B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
Efecto de ligación	Captación Activación de la estimulación de estallido respiratorio Inducción de muerte	Captación Liberación de gránulos	Captación Inhibición de la estimulación	Sin captación Inhibición de la estimulación	Inducción de muerte	Secreción de gránulos	Captación Inducción de muerte

2.2 Enfermedades relevantes

2.2.1 Cáncer

5 Una neoplasia, o tumor, es una masa neoplásica resultante de un crecimiento celular anormal incontrolado que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligno" generalmente significa que el tumor puede invadir y destruir estructuras corporales vecinas y extenderse a sitios distantes para causar la muerte (para una revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., WB Saunders Co., Filadelfia, páginas.68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y comportarse de manera diferente según su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en la que se originan y luego se diseminan a otra parte o partes del cuerpo donde comienzan un nuevo crecimiento y causan más destrucción.

15 Más de 1,2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y, si continúan las tendencias actuales, se espera que el cáncer sea la principal causa de muerte para el año 2010. El cáncer de pulmón y de próstata son las principales causas de muerte por cáncer en los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y de mama son las principales causas de muerte por cáncer para las mujeres en los Estados Unidos. Uno de cada dos hombres en los Estados Unidos será diagnosticado con cáncer en algún momento de su vida. Una de cada tres mujeres en los Estados Unidos será diagnosticada con cáncer en algún momento de su vida.

20 Aún no se ha encontrado una cura para el cáncer. Las opciones de tratamiento actuales, como la cirugía, la quimioterapia y el tratamiento con radiación, a menudo son ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

Terapia contra el cáncer

25 Actualmente, la terapia contra el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para erradicar las células neoplásicas en un paciente (vease, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., Capítulo 12, Sección IV). Recientemente, la terapia contra el cáncer también podría incluir terapia biológica o inmunoterapia. Todos estos enfoques presentan importantes inconvenientes para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Además, es posible que la cirugía no elimine por completo el tejido neoplásico. La radioterapia solo es eficaz cuando el tejido neoplásico muestra una mayor sensibilidad a la radiación que el tejido normal y, a menudo, la radioterapia también puede provocar efectos secundarios graves. La terapia hormonal rara vez se administra como agente único y, aunque puede ser eficaz, a menudo se usa para prevenir o retrasar la recurrencia del cáncer después de que otros tratamientos hayan eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias/inmunoterapias biológicas son limitadas en número y pueden producir efectos secundarios tales como erupciones o hinchazón, síntomas similares a los de la gripe, que incluyen fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo o reacciones alérgicas.

35 Con respecto a la quimioterapia, existe una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de los compuestos quimioterapéuticos contra el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, ya sea directa o indirectamente al inhibir la biosíntesis de los precursores del trifosfato de desoxirribonucleótido, para prevenir la replicación del ADN y la división celular concomitante (véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, octava edición (Pergamom Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, antimetabolitos, tales como metotrexato e hidroxiaurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, etc., aunque no necesariamente específicos del ciclo celular, destruyen las células durante la fase S debido a su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente la colchicina y los alcaloides de la vinca, tales como la vinblastina y la vincristina, interfieren con el ensamblaje de los microtúbulos y provocan una detención mitótica. Los protocolos de quimioterapia generalmente implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para aumentar la eficacia del tratamiento.

50 A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia tiene muchos inconvenientes (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., capítulo 12, sección 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos y la quimioterapia causa efectos secundarios importantes, y a menudo peligrosos, que incluyen náuseas graves, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. Además, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, aquellas células resistentes a los agentes quimioterapéuticos particulares utilizados en el protocolo de tratamiento a menudo demuestran ser resistentes a otros fármacos, incluso a aquellos agentes que actúan por mecanismos diferentes a los mecanismos de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina fármaco pleiotrópico o resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, debido a la resistencia a los fármacos, muchos cánceres resultan refractarios a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos para el cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer que ha demostrado ser refractario a los tratamientos estándar del cáncer, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. Una alternativa prometedora es la inmunoterapia, en la que las células cancerosas son dirigidas específicamente por anticuerpos específicos del antígeno del cáncer. Se han realizado grandes esfuerzos para aprovechar la especificidad de la respuesta inmune; por ejemplo, la tecnología de hibridomas ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos de tumores (véase Green MC et al., 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol.26 (suplemento 14): 43-51), y en los últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos ha aprobado los primeros MAb para la terapia contra el cáncer: Rituxin (anti-CD20) para el linfoma no Hodgkin y Herceptina [anti-(c-erb-2/HER-2)] para el cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora del anticuerpo, por ejemplo, para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo ("ADCC") es un obstáculo para dicho tratamiento. Por lo tanto, se necesitan métodos para mejorar la eficacia de dicha inmunoterapia.

2.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes

La inflamación es un proceso mediante el cual los glóbulos blancos y los productos químicos del cuerpo protegen nuestro cuerpo de la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Suele caracterizarse por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento de la zona afectada. Las sustancias químicas conocidas tales como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso y se liberan en una cascada ordenada y autolimitada hacia la sangre o los tejidos afectados. Esta liberación de sustancias químicas aumenta el flujo sanguíneo al área de la lesión o infección y puede resultar en enrojecimiento y calor. Algunos de los productos químicos provocan una fuga de líquido en los tejidos, lo que provoca hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un período limitado en el área relevante, funcionan en beneficio del cuerpo.

En los trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, el sistema inmunológico desencadena una respuesta inflamatoria cuando no hay sustancias extrañas para combatir y el sistema inmunológico normalmente protector del cuerpo causa daño a sus propios tejidos al atacarse a sí mismo por error. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con enfermedad de Crohn, y la membrana sinovial, el hueso y el cartílago de varias articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que progresan los trastornos autoinmunitarios, puede producirse la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, puede producirse un crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar solo a un órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, tiroides o páncreas), músculos, articulaciones y piel. Ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune del oído interno, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

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

La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es potencialmente incapacitante. Hay aproximadamente 2,9 millones de casos de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Dos o tres veces más mujeres se ven afectadas que hombres. La edad típica a la que ocurre la artritis reumatoide está entre los 25 y los 50 años. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71.000 jóvenes estadounidenses (de dieciocho años o menos), y afecta a seis veces más niñas que niños.

La artritis reumatoide es un trastorno autoinmune en el que el sistema inmunológico del cuerpo identifica incorrectamente las membranas sinoviales que secretan el líquido lubricante en las articulaciones como extrañas. Se produce inflamación y el cartílago y los tejidos en y alrededor de las articulaciones se dañan o destruyen. En casos graves, esta inflamación se extiende a otros tejidos articulares y al cartílago circundante, en el que puede erosionar o destruir huesos y cartílagos y provocar deformidades articulares. El cuerpo reemplaza el tejido dañado con tejido cicatricial, lo que hace que los espacios normales dentro de las articulaciones se estrechen y los huesos se fusionen. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchazón, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre y, a menudo, un dolor paralizante. Algunos síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez en las articulaciones al despertar que dura una hora o más; hinchazón en articulaciones específicas de un dedo o muñeca; hinchazón del tejido blando alrededor de las articulaciones; e hinchazón en ambos lados de la articulación. La hinchazón puede ocurrir con o sin dolor y puede empeorar progresivamente o permanecer igual durante años antes de progresar.

El diagnóstico de artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, que incluyen: la ubicación específica y la simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez articular por la mañana, la presencia de protuberancias y nódulos debajo de la piel (nódulos reumatoides), resultados de pruebas de rayos X que sugieren artritis reumatoide y/o resultados positivos de un análisis de sangre llamado factor reumatoide. Muchas, pero no todas, las personas con artritis reumatoide tienen el anticuerpo del factor reumatoide en la sangre. El factor reumatoide puede estar presente en personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades también pueden hacer que el factor reumatoide se produzca en la sangre. Es por eso por lo que el diagnóstico de artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no solo en la presencia del factor reumatoide en la sangre.

El curso típico de la enfermedad es uno de síntomas articulares persistentes pero fluctuantes, y después de aproximadamente 10 años, el 90% de los que la padecen mostrarán daño estructural en los huesos y cartílagos. Un pequeño porcentaje tendrá una enfermedad breve que desaparece por completo, y otro pequeño porcentaje tendrá una enfermedad muy grave con muchas deformidades articulares y, en ocasiones, otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio causa erosión o destrucción de huesos y cartílagos en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmune de presentación persistente de antígenos, estimulación de células T, secreción de citocinas, activación de células sinoviales y destrucción articular. La enfermedad tiene un impacto importante tanto en el individuo como en la sociedad, causando un dolor significativo, deterioro funcional y discapacidad, además de costar millones de dólares en gastos de atención médica y salarios perdidos (véase, por ejemplo, el sitio web de los NIH y el sitio web del NIAID).

La terapia actualmente disponible para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis suele ser antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de la Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los "medicamentos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten solo en estas líneas de tratamiento. Los avances recientes en la comprensión de la patogenia de la artritis reumatoide han llevado al uso de metotrexato en combinación con anticuerpos contra citocinas o receptores solubles recombinantes. Por ejemplo, se han usado receptores solubles recombinantes para el factor de necrosis tumoral (TNF)- α en combinación con metotrexato en el tratamiento de la artritis. Sin embargo, solo alrededor del 50% de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α , tales como receptores solubles recombinantes para TNF- α , muestran una mejora clínicamente significativa. Muchos pacientes permanecen refractarios a pesar del tratamiento. Aún quedan problemas de tratamiento difíciles para los pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden prevenir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, ningún tratamiento es ideal y no existe cura. Se necesitan nuevas terapias que traten de manera más eficaz la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunes.

2.2.3 Enfermedades infecciosas

Los agentes infecciosos que causan enfermedades se dividen en cinco grupos: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (gusanos). La notable variedad de estos patógenos ha provocado la selección natural de dos características cruciales de la inmunidad adaptativa. En primer lugar, la ventaja de poder reconocer una amplia gama de patógenos diferentes ha impulsado el desarrollo de receptores en las células B y T de igual o mayor diversidad. En segundo lugar, los distintos hábitats y ciclos de vida de los patógenos deben ser contrarrestados por una serie de distintos mecanismos efectores. Los rasgos característicos de cada patógeno son su modo de transmisión, su mecanismo de replicación, su patogenia o los medios por los que causa la enfermedad y la respuesta que provoca.

El registro de sufrimiento humano y muerte por viruela, cólera, tifus, disentería, malaria, etc., establece la eminencia de las enfermedades infecciosas. A pesar de los sobresalientes éxitos en el control logrados por la mejora del saneamiento, la inmunización y la terapia antimicrobiana, las enfermedades infecciosas continúan siendo un problema común y significativo de la medicina moderna. La enfermedad más común de la humanidad, el resfriado común, es una enfermedad infecciosa, al igual que la temida enfermedad moderna del SIDA. Algunas enfermedades neurológicas crónicas que antes se pensaba que eran enfermedades degenerativas han demostrado ser infecciosas. Hay pocas dudas de que el futuro seguirá revelando las enfermedades infecciosas como problemas médicos importantes.

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

Una categoría de enfermedades infecciosas es, por ejemplo las infecciones virales. Las enfermedades virales de una amplia gama de tejidos, incluidos el tracto respiratorio, el SNC, la piel, el tracto genitourinario, los ojos, los oídos, el sistema inmunitario, el tracto gastrointestinal y el sistema musculoesquelético, afectan a una gran cantidad de seres humanos de todas las edades (véase la Tabla 328-2) en: Wyngaarden y Smith, 1988, Cecil Textbook of Medicine, 18ª edición, WB Saunders Co., Filadelfia, páginas 1750-1753). Aunque se ha invertido un esfuerzo considerable en el diseño de terapias antivirales eficaces, las infecciones virales continúan amenazando la vida de millones de personas en todo el mundo. En general, los intentos de desarrollar fármacos antivirales se han centrado en varias etapas del ciclo de vida viral (véase, por ejemplo, Mitsuya et al., 1991, FASEB J. 5: 2369-2381, que trata sobre el VIH). Sin

embargo, un inconveniente común asociado con el uso de muchos fármacos antivirales actuales son sus efectos secundarios deletéreos, tales como la toxicidad para el huésped o la resistencia de ciertas cepas virales.

3. Resumen de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una región Fc variante de IgG1 humana definida en la reivindicación 1. En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica definida en la reivindicación 16. Otras características de la invención se definen en la reivindicaciones dependientes. La presente invención se basa, en parte, en la identificación de regiones Fc de cadena pesada de IgG1 humana mutante, con afinidades alteradas por los receptores FcγR (por ejemplo, los FcγR activadores, FcγR inhibidores), usando un sistema de presentación en levadura. En consecuencia, la invención se refiere a anticuerpos 10 que comprenden una región Fc variante, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyen inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, modificaciones que alteran la afinidad de la región Fc variante por una región FcγR. Dicha modificación de uno o más aminoácidos aumenta la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA. En una realización preferida, las moléculas de la invención se unen además específicamente a Fcγ (a través de la región Fc) con una afinidad menor que una molécula comparable (es decir, que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de la invención excepto por uno o más 15 modificaciones de aminoácidos en la región Fc) que comprende la región Fc de tipo silvestre que se une a FcγRIIB. En algunas realizaciones, la invención abarca anticuerpos con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y mejoran la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos con regiones Fc variantes, que tienen una o 20 más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA pero no alteran la afinidad de las regiones Fc variantes por FcγRIIB en relación con una región comparable con una región Fc de tipo silvestre.

También se describen en el presente documento moléculas que son homodímeros o heterodímeros de regiones Fc. 25 Los heterodímeros que comprenden regiones Fc se refieren a moléculas en las que las dos cadenas Fc tienen secuencias iguales o diferentes. En las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, cada cadena puede tener una o más modificaciones diferentes de la otra cadena. En las moléculas heterodiméricas que comprenden regiones Fc variantes, una cadena puede contener la región Fc de tipo silvestre y las otras cadenas pueden comprender una o más modificaciones. Los métodos de modificación genética de moléculas que contienen 30 Fc heterodimérico son conocidos en la técnica.

También se describen en el presente documento moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante no se une a ningún FcγR o se une con una afinidad reducida, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, según se determina mediante ensayos estándar (por 35 ejemplo, ensayos *in vitro*) conocidos por un experto en la técnica. Dichas moléculas pueden comprender una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en la que dicha FcγR es FcγRIIIA. Dichas moléculas pueden comprender una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un 40 FcγR, en la que dicha FcγR es FcγRIIA. Dichas moléculas pueden comprender una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en la que dicha FcγR es FcγRIIB.

Las afinidades y propiedades de unión de los anticuerpos de la invención para un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos de base bioquímica o inmunológica) conocidos en la técnica para determinar 45 interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye, pero no se limitan a, el ensayo ELISA, el ensayo de resonancia de plasmón superficial y los ensayos de inmunoprecipitación (véase la Sección 5.2.1). Preferiblemente, las propiedades de unión de los anticuerpos de la invención también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR (véase la Sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención tienen propiedades de unión 50 similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en este documento) como aquellos de los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye los anticuerpos de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos *in vitro* pero exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo 55 silvestre, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 329, 331 o 332, y no incluya o no sea únicamente sustitución con cualquiera de: alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326 o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la 60 posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición

334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335.

5 En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIA, siempre que una o más modificaciones de aminoácidos no incluyan o no sean únicamente sustitución con una alanina en cualquiera de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272 o 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 10 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

15 En una realización específica preferida, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que hacen un contacto directo con FcγR basado en análisis cristalográfico y estructural de interacciones Fc-FcγR como las descritas por Sondermann et al., (2000 Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E), y bucle de 20 aminoácidos 327-332 (F/G). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que no hace contacto directo con un FcγR basado en análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión Fc-FcγR.

25 En otra realización preferida, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula se une a un FcγR con una afinidad alterada relativa a una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre, siempre que dicha al menos una modificación de aminoácido no incluya o no sea únicamente una sustitución en ninguna de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. En una realización 30 específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula se une a un FcγR con una afinidad alterada relativa a una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre, siempre que dicha región Fc variante no incluya o no sea únicamente una sustitución en ninguna de las posiciones 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 y no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360, 326 o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la 40 posición 334; o una leucina en la posición 334; una lisina en la posición 335 una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301.

45 En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante no incluye o no es únicamente una sustitución en ninguna de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 y no tenga una histidina, glutamina o tirosina en la posición 280; una serina, glicina, treonina o tirosina en la posición 290, una leucina o isoleucina en la posición 300; una asparagina en la posición 294, una prolina en la posición 296; una prolina, asparagina, ácido aspártico o valina en la posición 298; una lisina en la posición 295. En otra realización preferida más, la invención abarca un anticuerpo que comprende una 50 región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a un FcγR con una afinidad reducida con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no tenga únicamente una sustitución en ninguna de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439. En otra realización preferida más, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicha molécula se une a un FcγR con una 55 afinidad mejorada con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre siempre que dicha región Fc variante no tenga o no sea únicamente una sustitución en ninguna de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430.

En una realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 2 veces, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en más de 2 veces, en al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos de la invención que comprenden una región Fc variante se unen específicamente a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con al menos 65%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200% más de afinidad con respecto a una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre. Preferiblemente, tales medidas son ensayos *in vitro*.

La invención abarca anticuerpos con afinidades alteradas por los receptores Fcγ activadores y/o inhibidores. En particular, la invención contempla anticuerpos con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA, en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB y también disminuyen la afinidad de las regiones Fc variantes por FcγRIIA en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones más, la invención abarca anticuerpos con regiones Fc variantes, cuyas modificaciones disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA pero no alteran la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en relación con una molécula comparable con una región Fc de tipo silvestre.

En una realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIA y FcγRIIB con afinidad de tipo silvestre. En una determinada realización, una o más modificaciones de aminoácidos no son una sustitución con alanina en ninguna de las posiciones 256, 298, 333 o 334.

En otra realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones), cuyas una o más modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA y disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIA y FcγRIIB con afinidad de tipo silvestre. En una determinada realización, las una o más modificaciones de uno o más aminoácidos no es una sustitución con arginina en la posición 320.

En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención con afinidades alteradas para activar y/o receptores inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en la que dicha modificación de uno o más aminoácidos es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10) (véase Tabla 5); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59), en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina.

El método preferido para cribar e identificar moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad FcγRIIIA mejorada) es la tecnología de presentación en la superficie de levadura (para revisión, véase Boder y Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444). Específicamente, la presentación en la superficie de la levadura es un método genético mediante el cual los polipéptidos que comprenden mutantes de Fc se expresan en la pared celular de la levadura en una forma accesible para interactuar con FcγR. La presentación en la superficie de la levadura de los anticuerpos de la invención que contienen Fc mutante puede realizarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica o los métodos específicos descritos en el presente documento.

En el presente documento se describe un método para seleccionar proteínas de fusión Fc mutantes con una propiedad de unión deseable, por ejemplo, la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a FcγRIIIA con una afinidad mayor que la de un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA. Las células de levadura que presentan las proteínas de fusión Fc mutantes se pueden cribar y caracterizar mediante cualquier ensayo bioquímico o inmunológico conocido por los expertos en la técnica para evaluar las interacciones de

unión. El cribado de proteínas de fusión Fc mutantes puede realizarse usando uno o más ensayos bioquímicos, por ejemplo, un ensayo ELISA.

El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por Fc γ R alteradas (por ejemplo, afinidad por Fc γ RIIIA mejorada) se puede realizar utilizando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos bioquímicos, preferiblemente en una forma de alto rendimiento. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-Fc γ R, es decir, la unión específica de una región Fc a un Fc γ R, que incluye, pero no se limitan a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis de equilibrio. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por Fc γ R alteradas (por ejemplo, afinidad por Fc γ RIIIA mejorada) se puede realizar utilizando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos funcionales, preferiblemente en una forma de alto rendimiento. Los ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R tales como los descritos en este documento en la Sección 5.2.6. Los ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por Fc γ R alteradas (por ejemplo, afinidad por Fc γ RIIIA mejorada) se puede realizar utilizando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos bioquímicos en combinación o en paralelo con uno o más ensayos funcionales, preferiblemente en una forma de alto rendimiento.

Un método preferido para medir la interacción Fc γ R-Fc es un ensayo desarrollado por los inventores, que permite la detección y cuantificación de la interacción, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para Fc γ RIIB y Fc γ RIIIA. El método implica la formación de un complejo Fc γ R (por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIB) que tiene una avidéz mejorada por una región Fc, en relación con un Fc γ R no complejada. También se describe en el presente documento un método para producir un complejo Fc γ R tetramérico, en el que dicho complejo tetramérico tiene una mayor afinidad por una región Fc, en relación con la afinidad de un Fc γ R monomérica por la región Fc, comprendiendo dicho método: (i) producir una proteína de fusión, de manera que una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos se una operativamente a la región soluble de Fc γ R; (ii) biotilinar la proteína producida usando una enzima BirA de *E. coli*; (iii) mezclar la proteína biotilina producida con estreptavidina-ficoeritrina en una proporción molar apropiada, de modo que se forme un complejo Fc γ R tetramérico.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos que comprenden regiones Fc se unen a los complejos Fc γ R tetraméricos, formados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, con una afinidad al menos 8 veces mayor que la que se unen al Fc γ R monomérico no complejado. La unión de polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos tetraméricos Fc γ R puede determinarse usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

También se describe en este documento el uso de los inmunocomplejos formados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o sin células.

La invención proporciona inmunoglobulinas modificadas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA. Dichas inmunoglobulinas incluyen moléculas de IgG que contienen naturalmente regiones de unión a Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIB), o derivados de inmunoglobulina que han sido modificados para contener una región de unión de Fc γ R (por ejemplo, regiones de unión a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIB). Las inmunoglobulinas modificadas de la invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se una, preferiblemente, de forma inmuno-específica, es decir, compite con la unión no específica determinada por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para analizar la unión específica de antígeno-anticuerpo, un antígeno y que contiene una región de unión de Fc γ R (por ejemplo, una región de unión de Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIB). Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos por disulfuro y fragmentos que contienen un dominio VL o VH o incluso una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, modificado para contener o fusionado a una región de unión de Fc γ R.

En cierta realización, la invención abarca inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA de manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. La función efectora de los anticuerpos de la invención puede ensayarse usando cualquier ensayo descrito en el presente documento o conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que comprenden una región Fc variante con una afinidad mejorada por Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA tienen una actividad de ADCC mejorada con respecto a la de tipo silvestre en al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces.

En el presente documento se describe la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de uno o más residuos de aminoácidos, cuyas modificaciones modulan la afinidad del anticuerpo terapéutico por un receptor activador de FcγR y/o un receptor inhibidor de FcγR. También se describe en el presente documento la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante la modificación de uno o más residuos de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Además, se describe la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) en la región Fc mediante la modificación de uno o más residuos de aminoácidos, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA y disminuye aún más la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. Los anticuerpos terapéuticos modificados pueden tener además una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad de ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., según se determina mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo monoclonal humanizado modificado específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, anticuerpo humanizado Ab4D5 como se describe en Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9) que comprende la modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica más, los anticuerpos monoclonales humanizados modificados específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano de ratón modificado, 2H7 que comprende la modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 también puede disminuir más la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica más, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado, 2H7, puede tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo anti-FcγRIIB modificado que incluye, pero no se limitan a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/403.266 presentada el 12 de agosto de 2002 y la solicitud de los Estados Unidos No. 10/643.857 presentada el 14 de agosto de 2003, con el número de expediente del abogado 011183-010-999, que comprende la modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA. Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB que pueden modificarse son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-4592 (depositado en la ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB también puede disminuir aún más la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado puede tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y se describe y ejemplifica en el presente documento. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal 2B6 comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina, y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59).

También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención identificado mediante los métodos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención pueden obtenerse y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica. También se describe un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. También se describe un vector que comprende dicho ácido nucleico. También se describen las células huésped que contienen los vectores o polinucleótidos.

También se describen métodos para la producción de los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, en particular, mediante expresión recombinante. En el presente documento se describe un método para producir de forma recombinante un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método: (i) cultivar en un medio una célula huésped que comprende

un ácido nucleico que codifica dicha molécula, en condiciones adecuadas para la expresión de dicha molécula; y (ii) recuperación de dicha molécula de dicho medio.

Las moléculas identificadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento son útiles para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en el que se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa y para mejorar la eficacia terapéutica de anticuerpos terapéuticos cuyo efecto está mediado por ADCC.

En el presente documento se describe un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une al antígeno del cáncer, que ha sido modificado de acuerdo con los métodos descritos en este documento. En el presente documento se describe un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno del cáncer, comprendiendo dicho anticuerpo terapéutico una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que el anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones 329, 331 o 332, y no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360 o 430; una lisina en la posición 330; una treonina en la posición 339; una metionina en la posición 320; una serina en la posición 326; una asparagina en la posición 326; un ácido aspártico en la posición 326; un ácido glutámico en la posición 326; una glutamina en la posición 334; un ácido glutámico en la posición 334; una metionina en la posición 334; una histidina en la posición 334; una valina en la posición 334; o una leucina en la posición 334. También se describe en el presente documento un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno del cáncer, comprendiendo dicho anticuerpo terapéutico una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre de manera que dicho anticuerpo terapéutico se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo silvestre que se une a FcγRIIIA, y dicho anticuerpo terapéutico se une además específicamente a FcγRIIB con una afinidad menor que un anticuerpo terapéutico que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIB, siempre que dicha región Fc variante no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 298, 333, o 334. También se describe en este documento un método para tratar el cáncer en un paciente caracterizado por un antígeno del cáncer, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a dicho antígeno del cáncer y dicho anticuerpo terapéutico comprende una región Fc variante de modo que el anticuerpo tenga una actividad de ADCC mejorada.

Se describe en el presente documento un método para tratar un trastorno autoinmune y/o trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, y dicha molécula se une además específicamente a FcγRIIIA con una afinidad menor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, y dicha molécula se une a un complejo inmune (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo). También se describe un método para tratar un trastorno autoinmune y/o trastorno inflamatorio que comprende además administrar uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, usados para el tratamiento y/o prevención de tales enfermedades.

En el presente documento se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la invención que se unen a un agente infeccioso o receptor celular para el mismo. Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o prevenidas por los anticuerpos de la invención son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes tienen una función efectora de anticuerpo mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En una realización específica, los anticuerpos de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa mejorando la fagocitosis y/o la opsonización del agente infeccioso que causa la enfermedad infecciosa. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa mejorando la ADCC de las células infectadas que causan la enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o agentes terapéuticos

adicionales conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa. También se contempla el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa.

- 5 La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluidos, pero no se limitan a, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores.

3.1 Definiciones

- 10 Como se usa en este documento, el término "región Fc" se usa para definir una región terminal C de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar ligeramente, se define que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 hasta el terminal carboxilo. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana generalmente se extiende desde los aminoácidos 231 al aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana generalmente se extiende desde los aminoácidos 342 a 447. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también denominada como dominio "Cy2") generalmente se extiende desde el aminoácido 231-340. El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

- 20 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU tal como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humana.

La "región bisagra" se define generalmente como que se extiende desde Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

- 25 Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id contra anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

- 35 Como se usa en este documento, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada por la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado" como se usa en este documento también se refiere a un polipéptido o proteína que ha sido modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede producir un polipéptido o proteína derivado mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado o derivado de proteína posee una función similar o idéntica al polipéptido o proteína del que se deriva.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma con base en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero no se limita a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

- 50 Como se usa en este documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmune" se usa indistintamente con el término "trastorno autoinmune" para referirse a una condición en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con inflamación. Además, la inflamación puede o no ser causada por un trastorno autoinmune. Por lo tanto, ciertos trastornos se pueden caracterizar tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

Como se usa en este documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor que resulta de un crecimiento anormal incontrolado de células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales vecinas y se ha extendido a sitios distantes. El cáncer está asociado con un antígeno de cáncer específico.

Como se usa en este documento, el término "agente inmunomodulador" y variaciones del mismo se refieren a un agente que modula el sistema inmunológico de un huésped. Un agente inmunomodulador puede ser un agente inmunosupresor. Un agente inmunomodulador puede ser un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente según se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. No es necesario que los epítipos antigénicos sean inmunogénicos.

Como se usa en este documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 aminoácidos contiguos residuos de ácido, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. Un fragmento de un polipéptido puede retener al menos una función del polipéptido.

Como se usa en este documento, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que prestan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una mayor capacidad para atravesar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener tanto porciones monocatenarias como bicatenarias y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la aparición de la enfermedad, por ejemplo, retrasar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente o agentes que se pueden usar en la prevención de un trastorno, o en la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o propagación de la enfermedad hiperproliferativa, en particular el cáncer, o la aparición de la misma en un paciente, incluidos, pero no se limitan a, los predispuestos a la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo los genéticamente predispuestos al cáncer o previamente expuestos a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedades. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedades.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en este documento, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administran los agentes profilácticos

y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Se puede administrar un primer agente profiláctico o terapéutico antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

4. Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Análisis SDS-PAGE del FcγR soluble recombinante

La pureza de las proteínas de FcγR solubles recombinantes se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Carril 1: FcγRIIIA soluble recombinante purificado; Carril 2: marcador de peso molecular; Carril 3: marcador de peso molecular; Carril 4: FcγRIIB soluble recombinante purificado. Los guiones se refieren al peso molecular de los marcadores, de arriba a abajo, corresponden a un peso molecular de 98, 50, 36 y 22 KDa respectivamente.

Figura 2: Ensayo Elisa de FcγR soluble recombinante

La unión directa de FcγRIIIA soluble recombinante purificada a IgG agregada y monomérica se determinó usando un ensayo ELISA. Se compara la unión de IgG biotinilada agregada (■) e IgG monomérica biotinilada (◆). El anticuerpo 3G8 bloquea la unión de IgG biotinilada agregada a FcγRIIIA (X).

Figuras 3A y 3B: Caracterización del complejo tetramérico de FcγRIIIA mediante un ensayo Elisa

A. El complejo FcγRIIIA tetramérico soluble se une específicamente a la IgG humana monomérica soluble. La unión de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana es bloqueada por 3G8 (◆), un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA de ratón; el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que alberga la mutación D265A no pudo bloquear la unión de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana agregada (Δ).

B. La unión del complejo FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana monomérica soluble (■) se compara con la unión de IgG humana (□) a FcγRIIIA soluble monomérica.

Figuras 4A y 4B: Caracterización del complejo tetramérico de FcγRIIIA mediante un ensayo de perlas magnéticas

A. Figura 4A: Complejo FcγRIIIA: dos FcγRIIIA (forma rellena) se unen mediante un anticuerpo monoclonal DJ130c (1^{er} Ab); el F(ab)₂ anti-ratón está conjugado con PE (círculo).

B. Análisis FACS de FcγRIIIA unido a perlas recubiertas con Fc: (a) perlas solas; (b) complejo sin FcγRIIIA; (c) complejado con FcγRIIIA; (d) complejado con FcγRIIIA y LNK16.

Figura 5: Presentación esquemática de constructos que contienen Fc

Se presenta un diagrama esquemático de los dominios Fc de IgG1 clonados en pYD1. El cuadro sin relleno representa los dominios bisagra-CH2-CH3; las líneas verticales paralelas representan el dominio CH1. En el caso de los constructos GIF206 y 227; se muestran los aminoácidos del terminal N. Los residuos subrayados corresponden a la región de bisagra; el * representa la etiqueta del epítipo Xpress; los recuadros sombreados representan el enlazador Gly4-Ser y los recuadros punteados representan el gen Aga2p.

Figuras 6A-H: Análisis FACS de las proteínas de fusión Fc en la pared de la célula de levadura

Las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humano conjugado con PE (Figuras 6A-6D) o con HP6017 (Sigma), un anticuerpo monoclonal específico de ratón anti-IgG1 humana Fc (CH3) (Figuras 6E-6H). A y E representan el vector solo; los paneles B y F representan el constructo CH1-CH3; los paneles C y G representan el GIF227; y los paneles D y H representan el constructo GIF 206.

Figuras 7A-C: Unión de FcγRIIIA tetramérica soluble a las proteínas de fusión Fc mostradas en la superficie

Células que contienen pYD1-CH1 (A); pYD-CH1-D265A (B); y el vector pYD (C) se cultivaron en condiciones para expresar proteínas de fusión Aga2p en la superficie celular. Las células se incubaron con FcγRIIIA a 0,15 mM, 7,5 mM y 7,5 mM, respectivamente, y se analizaron mediante FACS.

Figura 8: Caracterización de la unión de FcγRIIIA tetramérica soluble a las proteínas de fusión Fc presentadas en la superficie

Se analizó la unión del complejo tetramérico de FcγRIIIA a proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura. Se preincubaron complejos tetraméricos de FcγRIIIA conjugados con PE con diferentes concentraciones de 3G8 (◆), LNK (A) o un control de isotipo irrelevante (■), y posteriormente se incubaron con las células de levadura. Las células se analizaron mediante FACS para determinar la fluorescencia de PE. El porcentaje de células que se unieron al complejo tetramérico de FcγRIIIA se representó en el eje y.

Figura 9: Ejemplo de cuadrante de clasificación para seleccionar mutantes de Fc con mayor unión a FcγRIIIA

Las células se tiñeron con complejos tetraméricos de FcγRIIIA conjugado con PE (eje y) y anticuerpo conjugado anti-Fc-FITC (eje x). El área encerrada representa el cuadrante de clasificación configurada para seleccionar ~1,0% de la población celular.

5 Figuras 10A-N: Análisis FACS de algunos de los mutantes de Fc identificados que tienen una afinidad aumentada por los complejos tetraméricos de FcγRIIIA

10 Los clones individuales que albergaban el plásmido pYD-CH1 que contenía mutaciones de Fc independientes se amplificaron en medios selectivos que contenían glucosa, se indujeron para la expresión de Fc en medios selectivos que contenían galactosa y posteriormente se analizaron mediante FAC. Las Figuras 10A y B representan células que albergan Fc de tipo silvestre; Las Figuras 10C y D representan el mutante nº 5; las Figuras 10E y F representan el mutante nº 20; las Figuras 10G y H representan el mutante nº 21; las Figuras 10 I y J representan el mutante nº 24; las Figuras 10K y L representan el mutante nº 25; las Figuras 10M y N representan el mutante nº 27. Las células se tiñeron con complejo tetramérico de FcγRIIIA (Figuras 10 A, C, E, G, I, K y M) o complejo tetramérico de FcγRIIB (Figuras 10B, D, F, H, J, L y N).

15 Figuras 11A-B: Caracterización de mutantes de Fc en el anticuerpo monoclonal 4-4-20 mediante Elisa

20 Los dominios Fc de los plásmidos pYD-CH1 se clonaron en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 4-4-20 quimérico. El anticuerpo monoclonal 4-4-20 se expresó en células 293 y se recogieron los sobrenadantes. Las placas de ELISA se recubrieron con BSA conjugada con fluoresceína para capturar los anticuerpos mutantes 4-4-20 quiméricos. Los receptores FcγRIIIA (Panel A) y FcγRIIB (Panel B) se recubrieron luego sobre las placas ELISA en las que se habían absorbido los anticuerpos monoclonales 4-4-20 con el fin de determinar las afinidades relativas de los receptores variantes por los dominios Fc. Los mutantes nº 15 y nº 29 fueron aislados no de unión incluidos como controles.

25 Figura 12: Actividad de ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal 4-4-20

30 Se evaluó la actividad de ADCC de los anticuerpos 4-4-20 que contenían regiones Fc mutantes y se comparó con la actividad de ADCC de un anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-26 (D265A), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E), MGFc-28 (N315I, A379M, D399E), MGFc-29 (F243I, V379E, G420V), MGFc-30 (F275V), MGFc-31 (P247L, N421K), MGFc-32 (D280E, S354F, A431D, L441I), MGFc-33 (K317N, F423 eliminado), MGFc-34 (F241L, E258G), MGFc-35 (R255Q, K326E), MGFc-36 (K218R, G281D, G385R).

Figuras 13A y B: Actividad de ADCC de mutantes en el anticuerpo monoclonal humanizado HER2/NEU

35 A. Se evaluó la actividad de ADCC de los anticuerpos monoclonales humanizados de HER2/neu que contenían regiones Fc mutantes y se comparó con la actividad de ADCC de un anticuerpo de Her2/neu de tipo silvestre. Los mutantes analizados son los siguientes: MGFc-5 (V379M), MGFc-9 (F243I, V379L), MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-13 (K334E, T359N, T366S), MGFc-27 (G316D, A378V, D399E).

40 B. Actividad de ADCC de mutantes adicionales en el contexto del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado MGFc-37 (K248M), MGFc-39 (E293V Q295E, A327T), MGFc-38 (K392T, P396L), MGFc-41 (H268N, P396L), MGFc-23 (K334E, R292L), MGFc-44, MGFc-45.

Figura 14: Captura del anticuerpo CH 4-4-20 en la superficie BSA-FITC

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

Figura 15: Sensograma de unión en tiempo real de FcγRIIIA a anticuerpos CH 4-4-20 que portan regiones Fc variantes
Se analizó la unión de FcγRIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portaban regiones Fc variantes a una concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo silvestre.

50 Figura 16: Análisis de los parámetros cinéticos de la unión de FcγRIIIA a anticuerpos que portan regiones Fc variantes
Los parámetros cinéticos para la unión de FcγRIIIA a anticuerpos que portan regiones Fc variantes se obtuvieron generando curvas de mejor ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo con base en los valores de $k_{\text{disociación}}$ calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32 a 34 segundos. Los valores de K_d y $k_{\text{disociación}}$ representan el promedio de dos concentraciones.

Figura 17: Sensograma de unión en tiempo real de proteínas de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos que portan regiones Fc variantes

60 Se analizó la unión de proteínas de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que portaban regiones Fc variantes a una concentración de 200 nM. Las respuestas se normalizaron al nivel de anticuerpo ch-4-4-20 obtenido para el tipo silvestre.

Figura 18: Análisis de parámetros cinéticos de proteínas de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos que portan regiones Fc variantes

Los parámetros cinéticos para la unión de FcγRIIB-Fc a anticuerpos que portan regiones Fc variantes se obtuvieron generando curvas de mejor ajuste separadas para 200 nM y 800 nM. La línea continua indica un ajuste de asociación que se obtuvo con base en los valores de $K_{\text{disociación}}$ calculados para las curvas de disociación en el intervalo de 32-34 segundos. Los valores de K_d y $K_{\text{disociación}}$ representan el promedio de dos concentraciones.

Figura 19: Relaciones de $K_{\text{disociación}}(\text{WT})/K_{\text{disociación}}(\text{Mut})$ para FcγRIIIA-Fc graficado contra datos de ADCC

Los números superiores a uno muestran una tasa de disociación disminuida para la unión de FcγRIIIA y una tasa de disociación aumentada para la unión de FcγRIIB-Fc en relación con el tipo silvestre. Los mutantes en el cuadro tienen una tasa de desactivación más baja para la unión de FcγRIIIA y una tasa de desactivación más alta para la unión de FcγRIIB-Fc.

Figura 20: Competencia con FcγRIIIA sin etiquetar

Se implementó un cribado cinético para identificar mutantes de la región Fc con tasas de $K_{\text{disociación}}$ mejoradas para la unión de FcγRIIIA. Se incubó una biblioteca de variantes de la región Fc que contenían la mutación P396L con FcγRIIIA-Enlazador-Avitag biotinilado 0,1 μM durante una hora y luego se lavó. Posteriormente se incubó FcγRIIIA 0,8 μM sin etiquetar con la levadura etiquetada para diferentes puntos de tiempo. Se centrifugó la levadura y se eliminó el FcγRIIIA no etiquetado. La levadura unida al receptor se tiñó con SA (estreptavidina): PE (ficoeritrina) para el análisis de FACS.

Figura 21: Análisis FACS con base en el cribado cinético

Con base en la $K_{\text{disociación}}$ calculada a partir de los datos presentados en la Figura 20, se eligió una selección de punto de tiempo de un minuto. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca con monómero FcγRIIIA-Enlazador-Avitag biotinilado 0,1 μM; las células se lavaron y se incubaron con ligando no etiquetado durante un minuto; luego se lavó y se etiquetó con SA:PE. A continuación, las células se clasificaron mediante FACS, seleccionando los aglutinantes al 0,3% superiores. La biblioteca de P396L no seleccionada se comparó con las células de levadura seleccionadas para mejorar la unión por FACS. Los histogramas muestran el porcentaje de células que se combinan tanto con FcγRIIIA/PE como con Fc/FITC antihumano de cabra (arriba a la derecha).

Figura 22: Selección con base en el agotamiento en fase sólida de aglutinantes de FcγRIIB Fc

La biblioteca de P396L se cribó con base en el agotamiento de FcγRIIB y la selección de FcγRIIIA utilizando perlas magnéticas. El agotamiento de FcγRIIB mediante perlas magnéticas se repitió 5 veces. Se analizó la población de levadura resultante y se encontró que mostraba más del 50% de tinción celular con Fc antihumano de cabra y un porcentaje muy pequeño de células teñidas con FcγRIIIA. Posteriormente, las células se seleccionaron dos veces mediante FACS usando FcγRIIIA-Enlazador-Avitag biotinilado 0,1 μM. Las células de levadura se analizaron para determinar la unión de FcγRIIIA y FcγRIIB después de cada clasificación y se compararon con la unión de tipo silvestre.

Figura 23: Tasas relativas de lisis de células diana SKBR3 mediada por mutantes de FC que albergan 4D5 quiméricos
Se calculó la clasificación relativa de lisis para cada Fc mutante ensayado. Las tasas de lisis para el anticuerpo 4D5 con mutantes de Fc se dividieron por la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 4D5 de tipo silvestre. Los datos de al menos 2 ensayos independientes se promediaron y se representaron en el histograma. Para cada Fc mutante, se muestran los datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes. Las concentraciones de anticuerpo se eligieron para flanquear el punto a lo largo de la curva en el que la lisis era ~ 50%.

Figura 24: Tasas relativas de lisis de células Daudi mediada por mutantes de FC que albergan 2H7 quiméricos

Se calculó la clasificación relativa de lisis para cada mutante Fc ensayado. Las tasas de lisis para el anticuerpo 2H7 con mutantes de Fc se dividieron por la tasa de lisis mediada por el anticuerpo 2H7 de tipo silvestre. Los datos de al menos 1-2 ensayos independientes se promediaron y se representaron en el histograma. Para cada mutante de Fc se muestran los datos de dos concentraciones de anticuerpo diferentes, las concentraciones de anticuerpo se eligieron con base en el punto a lo largo de la curva en el que la lisis fue ~ 50%.

5. Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a anticuerpos como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también que incluyen inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante por un FcγR. Más particularmente, la invención proporciona anticuerpos que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable, es decir, siendo la misma que dicha molécula con una región Fc variante pero sin una o más modificaciones de aminoácidos, que comprende la región Fc de tipo silvestre determinada por métodos conocidos por un experto en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR y métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, un ensayo ELISA o un ensayo de resonancia de plasmón superficial. La presente divulgación también incluye moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIIA con una afinidad reducida con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen además específicamente a FcγRIIB (a través de la

región Fc) con una afinidad menor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIB. En algunas realizaciones, la invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIA y FcγRIIB con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIB con una mayor afinidad, con respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos que comprenden la región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante se une a FcγRIIB con una afinidad reducida, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre.

En el presente documento se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante no muestra una unión detectable a ningún FcγR (por ejemplo, no se une a FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIA, según se determina mediante, por ejemplo, un ensayo ELISA), en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre.

En una realización específica, la invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en el que dicha FcγR es FcγRIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en el que dicha FcγR es FcγRIIA. También se describen moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en el que dicha FcγR es FcγRIIB. La invención se refiere particularmente a la modificación de anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales antiangiogénicos o antiinflamatorios específicos de tumor) para mejorar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos mejorando, por ejemplo, la función efectora de los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, mejorando la ADCC.

Las afinidades y propiedades de unión de los anticuerpos de la invención por un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR que incluye, pero no se limitan a, el ensayo ELISA, el ensayo de resonancia de plasmón superficial y los ensayos de inmunoprecipitación (véase la Sección 5.2.1). Preferiblemente, las propiedades de unión de los anticuerpos de la invención también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR (Véase Sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (como los descritos y divulgados en este documento) como los de los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye los anticuerpos de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos *in vitro* pero exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

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

En una realización específica preferida, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcγR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en posiciones que hacen un contacto directo con FcγR basado en análisis cristalográfico y estructural de interacciones Fc-FcγR como las descritas por Sondermann et al., 2000 (Nature, 406: 267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C/E), y bucle de aminoácidos 327-332 (F/G). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que hace un contacto directo con un FcγR basado en análisis estructural y cristalográfico.

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

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

En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención con afinidades alteradas para activación y/o receptores inhibidores que tienen regiones Fc variantes, tienen una o más modificaciones de aminoácidos, en las que dicha modificación de uno o más aminoácidos es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10) (véase la Tabla 5); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59), en la que al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina.

En algunas realizaciones, la invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante que tiene una modificación de aminoácido en una o más de las siguientes posiciones: 185, 142, 192, 141, 132, 149, 133, 125, 162, 147, 119, 166, 251, 292, 290, 291, 252, 288, 268, 256, 262, 218, 214, 205, 215, 247, 275, 202, 289, 258, 219, 279, 222, 246, 233, 246, 268, 244, 217, 253, 246, 224, 298, 280, 255, 218, 281, 284, 216, 223, 235, 221, 252, 241, 258, 227, 231, 215, 274, 287, 244, 229, 287, 291, 240, 281, 232, 269, 225, 246, 246, 293, 295, 248, 276, 268, 210, 288, 227, 221, 217, 261, 210, 242, 255, 240, 250, 247, 258, 246, 282, 219, 225, 270, 263, 272, 292, 233, 247, 254, 243, 347, 339, 392, 399, 301, 315, 383, 396, 385, 348, 333, 334, 310, 337, 371, 359, 366, 359, 379, 330, 318, 395, 319, 380, 305, 309, 335, 370, 378, 394, 386, 377, 358, 384, 397, 372, 326, 320, 375, 327, 381, 354, 385, 335, 387, 353,

375, 383, 397, 345, 375, 389, 335, 394, 316, 399, 315, 394, 382, 390, 369, 377, 304, 323, 313, 388, 339, 317, 365, 367, 340, 311, 312, 398, 343, 352, 362, 303, 308, 327, 307, 344, 328, 393, 355, 360, 306, 361, 355, 415, 408, 409, 407, 424, 401, 402, 435, 421, 431, 441, 440, 435, 431, 442, 400, 422, 406, 411, 422, 433, 406, 423, 420, 412, 447, 443, 414, 433, 428, 446, 402, 419, 410, 404, 427, 417, 433, 436, 438, 416. Preferiblemente, tales mutaciones dan como resultado moléculas que tienen una afinidad alterada por un FcγR y/o una función mediada por células efectoras según se determina usando métodos descritos y ejemplificados en este documento y conocidos por un experto en la técnica.

La invención abarca anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes que consisten en o que comprenden cualquiera de las mutaciones enumeradas en la tabla siguiente, la Tabla 2. (Téngase en cuenta que los anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes que consisten en mutaciones de sitio único o doble enumeradas en la Tabla 2 con un asterisco "*" se incluyen como ejemplos comparativos).

Tabla 2. Ejemplos de mutaciones

Mutantes de sitio único	Mutantes de sitio doble
K392R*	Q347H, A339V*
N315I*	S415I, L251F*
S132I*	K290E, L142P*
P396L	G285E, P247H*
P396H*	K409R, S166N*
A162V*	E334A, K334A*
R292L*	R292L, K334E*
T359N*	K288N, A330S*
T366S*	R255L, E318K*
V379L*	F243L, E318K*
K288N*	V279L, P395S*
A330S*	K246T, Y319F*
F243L*	F243I, V379L*
E318K*	K288M, K334E*
V379M*	K334E, E308D*
S219Y*	E233D, K334E*
V282M*	K246T, P396H*
D401V*	H268D, E318D*
K222N*	K246I, K334N*
K334I*	K320E, K326E*
K334E*	S375C, P396L
I377F*	K288N, K326N*
P247L*	P247L, N421K*
F372Y*	S298N, W381R*
K326E*	R255Q, K326E*
H224L*	V284A, F372L*
F275Y*	T394M, V397M*
L398V*	P247L, E389G*
K334N*	K290T, G371D*
S400P*	P247L, L398Q*
S407I*	P247L, I377F*
F372Y*	K326E, G385E*
T366N*	S298N, S407R*
K414N*	E258D, N384K*
M352L*	F241L, E258G*
T225S*	K370N, S440N*
I377N*	K317N, F423* eliminado
K248M*	P227S, K290E*
R292G*	K334E, E380D*
S298N*	P291S, P353Q*
D270E*	V240I, V281M*
E233G*	P232S, S304G*
	P247L, L406F*

	D399E, M428L*
	L251F, F372L*
	D399E, G402D*
	D399E, M428L*
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K326I, P396L
	H268D, P396L
	K210M, P396L
	L358P, P396L
	K334N, P396L
	V379M, P396L
	P227S, P396L
	P217S, P396L
	Q419H, P396L
	K370E, P396L
	L242F, P396L
	R255L, P396L
	V240A, P396L
	T250A, P396L
	P247S, P396L
	L410H, P396L
	Q419L, P396L
	V427A, P396L
	E258D, P396L
	N384K, P396L
	V323I, P396L
	P244H, P396L
	V305L, P396L
	S400F, P396L
	V303I, P396L
	A330V, Q419H*
	V263Q, E272D*
	K326E, A330T*

En otras realizaciones más, la invención abarca anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes que tienen más de dos modificaciones de aminoácidos. En la siguiente tabla se enumera un ejemplo no limitativo de tales variantes (Tabla 3). La invención abarca mutaciones enumeradas en la Tabla 3 que además comprenden una o más modificaciones de aminoácidos tales como las descritas en el presente documento. (Téngase en cuenta que los anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes que consisten en las combinaciones de mutaciones enumeradas en la Tabla 3 con un asterisco "*" se incluyen como ejemplos comparativos).

5

Tabla 3. Ejemplos de variantes de combinación

D399E, R292L, V185M*
R301C, M252L, S192T*
P291S, K288E, H268L, A141V*
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205E, F149Y, K133M*
S408I, V215I, V125L*
G385E, P247H*
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T*
H310Y, T289A, Y407V, E258D*
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M*
F243L, R255L, E318K*
K334E, T359N, T366S*
T256S, V305I, K334E, N390S*
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L*

ES 2 897 506 T3

K334E, T359N, T366S, Q386R*
K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M*
P217S, A378V, S408R*
P247L, I253N, K334N*
D312E, K327N, I378S*
D280E, S354F, A431D, L441I*
K218R, G281D, G385R*
P247L, A330T, S440G*
T355N, P387S, H435Q*
P247L, A431V, S442F*
P343S, P353L, S375I, S383N*
E216D, E345K, S375I*
K288N,A330S,P396L
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M*
G316D, A378V, D399E*
N315I, V379M, T394M*
K326Q, K334E, T359N, T366S*
A378V, N390I, V422I*
V282E, V369I, L406F*
V397M, T411A, S415N*
T223I, T256S, L406F*
L235P, V382M, S304G, V3051, V323I*
P247L, W313R, E388G*
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L*
F243I, V379L, G420V*
A231V, Q386H, V412M*
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L
P244A, K326I, C367R, S375I, K447T*
R301H, K340E, D399E*
C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V
E269K, K290N, Q311R, H433Y*
E216D, K334R, S375I*
T335N, P387S, H435Q*
K246I, Q362H, K370E*
K334E, E380D, G446V*
V303I, V369F, M428L*
K246E, V284M, V308A*
E293V, Q295E, A327T*
Y319F, P352L, P396L
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D
K290T, N390I, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K261N, K210M, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
A330V, H433Q, V427M*

V263Q, E272D, Q419H*
N276Y, T393N, W417R*
V282L, A330V, H433Y, T436R*
V284M, S298N, K334E, R355W*
A330V, G427M, K438R*
S219T, T225K, D270E, K360R*
K222E, V263Q, S298N*
E233G, P247S, L306P*
S219T, T225K, D270E*
S254T, A330V, N361D, P243L*
V284M, S298N, K334E, R355W R416T*

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de modo que una o más fracciones de carbohidratos se unen covalentemente a la molécula. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mejorada mediada por anticuerpos, por ejemplo, una actividad de ADCC mejorada. En algunas realizaciones, la invención comprende además anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe directa o indirectamente que interactúan con una fracción de carbohidrato del anticuerpo, incluidos, pero no se limitan a, los aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directa o indirectamente con una fracción de carbohidrato de un anticuerpo son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Jefferis et al., 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7.

La invención abarca anticuerpos que se han modificado introduciendo uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión a FcγR. Pueden introducirse sitios de glicosilación en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invención. Como se usa en el presente documento, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo al que un oligosacárido (es decir, carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos entre sí) se unirá específica y covalentemente. Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente unidas a la estructura de un anticuerpo mediante enlaces de N u O. La glicosilación ligada a N se refiere a la unión de una fracción de oligosacárido a la cadena lateral de una fracción de asparagina. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de una fracción oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Los anticuerpos de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluidos los sitios de glicosilación ligados a N y ligados a O. Cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación ligada a N o ligada a O conocido en la técnica puede usarse de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo de sitio de glicosilación unido a N que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Dicho sitio o sitios pueden introducirse en un anticuerpo de la invención usando métodos bien conocidos en la técnica a la que pertenece esta invención. Véase, por ejemplo, "In Vitro Mutagenesis", *Recombinante DNA: A Short Course*, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116. Un ejemplo de método para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de modo que se obtenga la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

También se describen en el presente documento métodos para modificar el contenido de carbohidratos de un anticuerpo de la invención mediante la adición o eliminación de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.218.149; el documento EP 0 359 096 B1; la publicación de los Estados Unidos No. US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la publicación de los Estados Unidos No. 2003/0115614; la patente de los Estados Unidos No. 6.218.149; la patente de los Estados Unidos No. 6.472,511. También se describen métodos para modificar el contenido de carbohidratos de un anticuerpo de la invención eliminando una o más fracciones de carbohidratos endógenos del anticuerpo. Por ejemplo, se prevé el desplazamiento del sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando las posiciones adyacentes a 297. Se prevé modificar la posición 296 de modo que la posición 296 y no la posición 297 esté glicosilada.

5.1 Polipéptidos y anticuerpos con regiones Fc variantes

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de regiones Fc de cadena pesada de IgG1 humana mutante, con afinidades alteradas por diferentes receptores FcγR, utilizando un sistema de presentación en levadura. En consecuencia, la invención se refiere a anticuerpos que comprenden una región Fc variante, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, pero también incluyen inserciones o eliminaciones) en una o más regiones, modificaciones que alteran la afinidad de la región Fc variante por una FcγR. Las afinidades y propiedades de unión de los anticuerpos de la invención para un FcγR se determinan inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR incluyendo pero no limitado al ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la Sección 5.2.1). Preferiblemente, las propiedades de

unión de los anticuerpos de la invención también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR (véase la Sección 5.2.6). En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en este documento) como los de los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye los anticuerpos de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos *in vitro* pero sí exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

A. Mutantes con afinidades alteradas mejoradas por FcγRIIIA y/o FcγRIIA

La invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, en las que tales modificaciones alteran la afinidad de la región Fc variante por un FcγR activador. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA al menos 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA más de 2 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención, una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, o 10 veces con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones más de la invención, una o más modificaciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en al menos 3, 4, 5, 6, 8 o 10 veces con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Dichos aumentos de veces se determinan preferiblemente mediante un ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial. En una realización específica, una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 329, 331 o 322 con ningún aminoácido. En determinadas realizaciones, la modificación de uno o más aminoácidos no incluye o no es únicamente una sustitución con cualquiera de alanina en las posiciones 256, 290, 298, 312, 333, 334, 359, 360 o 430; con lisina en la posición 330; con treonina en la posición 339; con metionina en la posición 320; con serina, asparagina, ácido aspártico o ácido glutámico en la posición 326 con glutamina, ácido glutámico, metionina, histidina, valina o leucina en la posición 334. En otra realización específica, una o más modificaciones de aminoácidos no incluyen o no son únicamente una sustitución en cualquiera de las posiciones 280, 290, 300, 294 o 295. En otra realización más específica, la modificación de uno o más aminoácidos no incluye o no es únicamente una sustitución en la posición 300 con leucina o isoleucina; en la posición 295 con lisina; en la posición 294 con asparagina; en la posición 298 con valina; prolina, asparagina o valina del ácido aspártico; en la posición 280 con histidina, glutamina o tirosina; en la posición 290 con serina, glicina, treonina o tirosina.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIA, siempre que dicha región Fc variante no tenga una alanina en ninguna de las posiciones 256, 290, 326, 255, 258, 267, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 331, 337, 268, 272 o 430; una asparagina en la posición 268; una glutamina en la posición 272; una glutamina, serina o ácido aspártico en la posición 286; una serina en la posición 290; una metionina, glutamina, ácido glutámico o arginina en la posición 320; un ácido glutámico en la posición 322; una serina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 326; una lisina en la posición 330; una glutamina en la posición 335; o una metionina en la posición 301. En una realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en al menos 2 veces, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otra realización específica, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más regiones, cuyas modificaciones aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en más de 2 veces, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones de la invención, una o más modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIA en al menos 3, 4, 5, 6, 8 o 10 veces en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre.

En una realización específica, la invención abarca anticuerpos que comprenden una región Fc variante, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones pero también incluyen inserciones o eliminaciones), modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 150%, y al menos 200%, con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre.

En una realización específica, una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc variante comprenden una sustitución en la posición 347 con histidina y en la posición 339 con valina; o una sustitución en la posición 425 con isoleucina y en la posición 215 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con

ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, en la posición 202 con metionina y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 275 con isoleucina, en la posición 334 con asparagina y en la posición 348 con metionina; o una sustitución en la posición 279 con leucina y en la posición 395 con serina; o una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 319 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 255 con leucina y en la posición 318 con lisina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 380 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 256 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 334 con ácido glutámico y en la posición 390 con serina; o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina, en la posición 394 con metionina y en la posición 424 con leucina; o una sustitución en la posición 233 con ácido aspártico y en la posición 334 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, en la posición 366 con serina y en la posición 386 con arginina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina. Los ejemplos de otras sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una afinidad mejorada por FcyRIIIA *in vitro* se describen a continuación y se resumen en la Tabla 4.

La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina y en la posición 379 con leucina, de modo que dicha molécula se une a FcyRIIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula similar que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con aproximadamente una afinidad 5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con leucina y en la posición 255 con leucina de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con aproximadamente una afinidad una vez mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina, de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 288 con metionina y en la posición 334 con ácido glutámico, de modo que dicha molécula se une a FcyRIIIA con una afinidad aproximadamente 3 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con aproximadamente una afinidad 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina y en la posición 399 con ácido glutámico, de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con una afinidad aproximadamente una vez mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina, de manera que dicha molécula se une a FcyRIIIA con aproximadamente una afinidad 2,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina, de modo que dicha molécula se une a FcyRIIIA con una afinidad aproximadamente 3 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcyRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina de modo que dicha molécula se une a FcyRIIIA con aproximadamente

una afinidad 4,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico y en la posición 327 con treonina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 421 con lisina, de modo que dicha molécula se une a FcγRIIIA con una afinidad aproximadamente 3 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina de modo que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 4,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico y en la posición 327 con treonina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con una afinidad aproximadamente 1,5 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente 2 veces más afinidad que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina y en la posición 396 con leucina, de manera que dicha molécula se une a FcγRIIIA con aproximadamente una afinidad 2 veces mayor que una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, según se determina mediante un ensayo ELISA.

También se describe en el presente documento como ejemplo un polipéptido aislado que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 396 con histidina. En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad mayor que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 248 con metionina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad similar a la de un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 392 con arginina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad similar a la de un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 132 con isoleucina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad similar a la de un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 162 con valina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 396 con leucina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un

tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 400 con prolina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 407 con isoleucina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 372 con tirosina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad similar a la de un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 366 con asparagina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 414 con asparagina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 225 con serina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una afinidad reducida que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 377 con asparagina.

En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente una 2 veces mayor afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 379 con metionina. En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con aproximadamente 1,5 veces más afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 248 con metionina.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención tienen una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA según se determina usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc a un FcγR, incluidos, pero no se limitan a, el ensayo ELISA, el ensayo de resonancia de plasmón superficial y los ensayos de inmunoprecipitación (véase la Sección 5.2.1). Preferiblemente, las propiedades de unión de estas moléculas con afinidades alteradas para activar los receptores FcγR también se correlacionan con su actividad determinada por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR (véase la Sección 5.2.6), por ejemplo, moléculas con las regiones Fc variantes con afinidad mejorada por FcγRIIIA tienen una actividad de ADCC mejorada. En las realizaciones más preferidas, los anticuerpos de la invención que tienen una propiedad de unión alterada por un receptor de Fc activador, por ejemplo, FcγRIIIA en un ensayo *in vitro* también tienen una propiedad de unión alterada en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en este documento). Sin embargo, la presente invención no excluye los anticuerpos de la invención que no exhiben una unión de FcγR alterada en ensayos *in vitro* pero sí exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

B. Mutantes con afinidad mejorada por FcγRIIIA y afinidad reducida o sin afinidad por FcγRIIB

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

por FcγRIIB en al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400%.

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

30 En una realización específica, el anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por FcγRIIIA y una afinidad reducida o sin afinidad por FcγRIIB según se determina con base en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20 que porta la región Fc variante comprende una sustitución en la posición 379 con metionina; en la posición 219 con tirosina; en la posición 282 con metionina; en la posición 401 con valina; en la posición 222 con asparagina; en la posición 334 con isoleucina; en la posición 334 con ácido glutámico; en la posición 275 con tirosina; en la posición 398 con valina.

35 La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho polipéptido se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad aproximadamente 10-15 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 10 veces menor que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina y en la posición 399 con ácido glutámico. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad aproximadamente 7 veces menor que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 3 veces menor que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina. La invención abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad aproximadamente 5 veces menor que un polipéptido comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre

según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina. La invención también abarca un anticuerpo que comprende una región Fc variante, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de modo que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIB con aproximadamente una afinidad 2 veces menor que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre según se determina mediante un ensayo ELISA, en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina y en la posición 396 con leucina.

C. Mutantes con afinidad mejorada por FcγRIIIA y FcγRIIB

La invención abarca anticuerpos que comprenden regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que aumentan la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y FcγRIIB en al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% y disminuye la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIB en al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400%. En una realización específica, el anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante con una afinidad mejorada por FcγRIIIA y una afinidad mejorada por FcγRIIB (según se determina con base en un ensayo ELISA y/o un ensayo basado en ADCC usando el anticuerpo ch-4-4-20 que porta la región Fc variante como se describe en el presente documento) comprende una sustitución en la posición 415 con isoleucina y en la posición 251 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico, en la posición 292 con leucina y en la posición 185 con metionina; o una sustitución en la posición 408 con isoleucina, en la posición 215 con isoleucina y en la posición 125 con leucina; o una sustitución en la posición 385 con ácido glutámico y en la posición 247 con histidina; o una sustitución en la posición 348 con metionina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 275 con isoleucina, en la posición 202 con metionina y en la posición 147 con treonina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina, en la posición 358 con metionina, en la posición 379 con metionina, en la posición 384 con lisina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 253 con asparagina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 320 con ácido glutámico y en la posición 326 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 343 con serina, en la posición 353 con leucina, en la posición 375 con isoleucina, en la posición 383 con asparagina; o una sustitución en la posición 394 con metionina y en la posición 397 con metionina; o una sustitución en la posición 216 con ácido aspártico, en la posición 345 con lisina y en la posición 375 con isoleucina; o una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 389 con glicina; o una sustitución en la posición 222 con asparagina, en la posición 335 con asparagina, en la posición 370 con ácido glutámico, en la posición 378 con valina y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 315 con isoleucina, en la posición 379 con metionina y en la posición 394 con metionina; o una sustitución en la posición 290 con treonina y en la posición 371 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 398 con glutamina; o una sustitución en la posición 326 con glutamina; en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 378 con valina, en la posición 390 con isoleucina y en la posición 422 con isoleucina; o una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico y en la posición 385 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 282 con ácido glutámico, en la posición 369 con isoleucina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 397 con metionina; en la posición 411 con alanina y en la posición 415 con asparagina; o una sustitución en la posición 223 con isoleucina, en la posición 256 con serina y en la posición 406 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 298 con asparagina y en la posición 407 con arginina; o una sustitución en la posición 246 con arginina, en la posición 298 con asparagina y en la posición 377 con fenilalanina; o una sustitución en la posición 235 con prolina, en la posición 382 con metionina, en la posición 304 con glicina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 323 con isoleucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina, en la posición 313 con arginina y en la posición 388 con glicina; o una sustitución en la posición 221 con tirosina, en la posición 252 con isoleucina, en la posición 330 con glicina, en la posición 339 con treonina, en la posición 359 con asparagina, en la posición 422 con isoleucina y en la posición 433 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con ácido aspártico y en la posición 384 con lisina; o una sustitución en la posición 241 con leucina y en la posición 258 con glicina; o una sustitución en la posición 370 con asparagina y en la posición 440 con asparagina; o una sustitución en la posición 317 con asparagina y una eliminación en la posición 423; o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina; o una sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 290 con ácido glutámico; o una sustitución en la posición 231 con valina, en la posición 386 con histidina y en la posición 412 con metionina; o una sustitución en las posiciones 215 con prolina, en la posición 274 con asparagina, en la posición 287 con glicina, en la posición 334 con asparagina, en la posición 365 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 293 con valina, en la posición 295 con ácido glutámico y en la posición 327 con treonina; o una sustitución en la posición 319 con fenilalanina, en la posición 352 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una

5 sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina; en una sustitución en la posición 268 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con treonina, en la posición 390 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 326 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 358 con prolina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 288 con arginina, en la posición 307 con alanina, en la posición 344 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 273 con isoleucina, en la posición 326 con ácido glutámico, en la posición 328 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 326 con isoleucina, en la posición 408 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 379 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 227 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 261 con asparagina, en la posición 210 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 419 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 242 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 255 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 240 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 250 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 247 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 419 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 427 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 258 con ácido aspártico y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 323 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 244 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 305 con leucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 400 con fenilalanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 303 con isoleucina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 290 con ácido glutámico, en la posición 369 con alanina, en la posición 393 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 210 con asparagina, en la posición 222 con isoleucina, en la posición 320 con metionina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 309 con leucina, en la posición 390 con histidina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con asparagina; en la posición 419 con arginina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 217 con alanina, en la posición 359 con alanina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 215 con isoleucina, en la posición 290 con valina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 275 con leucina, en la posición 362 con histidina, en la posición 384 con lisina y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 334 con asparagina; o una sustitución en la posición 400 con prolina; o una sustitución en la posición 407 con isoleucina; o una sustitución en la posición 372 con tirosina; o una sustitución en la posición 366 con asparagina; o una sustitución en la posición 414 con asparagina; o una sustitución en la posición 352 con leucina; o una sustitución en la posición 225 con serina; o una sustitución en la posición 377 con asparagina; o una sustitución en la posición 248 con metionina.

D. Mutantes sin ninguna unión a FcγR

También se describen en el presente documento moléculas que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, cuya región Fc variante no se une a ningún FcγR, según lo determinado por el estándar ensayos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre. Las una o más modificaciones de aminoácidos que eliminan la unión a todos los FcγR pueden comprender una sustitución en la posición 232 con serina y en la posición 304 con glicina; o una sustitución en la posición 269 con lisina, en la posición 290 con asparagina, en la posición 311 con arginina y en la posición 433 con tirosina; o una sustitución en la posición 252 con leucina; o una sustitución en la posición 216 con ácido aspártico, en la posición 334 con arginina y en la posición 375 con isoleucina; o una sustitución en la posición 247 con leucina y en la posición 406 con fenilalanina, o una sustitución en la posición 335 con asparagina, en la posición 387 con serina y en la posición 435 con glutamina; o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 380 con ácido aspártico y en la posición 446 con valina; o una sustitución en la posición 303 con isoleucina, en la posición 369 con fenilalanina y en la posición 428 con leucina; o una sustitución en la posición 251 con fenilalanina y en la posición 372 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con ácido glutámico, en la posición 284 con metionina y en la posición 308 con alanina; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico y en la posición 402 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 399 con ácido glutámico y en la posición 428 con leucina.

E. Mutantes sin funciones efectoras mediadas por FcγR

En una realización específica, los anticuerpos de la invención con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen una función efectora mejorada mediada por FcγR según se determina usando ensayos de actividad de ADCC descritos en este documento. Ejemplos de funciones efectoras que podrían estar mediadas por los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, unión de C1q, citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, etc. Las funciones efectoras de los anticuerpos de la

invencción pueden ensayarse usando métodos estándar conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en la Sección 5.2.6. En una realización específica, los anticuerpos de la invencción que comprenden una región Fc variante con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA median la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) 2 veces más eficazmente que un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invencción que comprenden una región Fc variante con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA median la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces más eficazmente que un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otra realización específica, los anticuerpos de la invencción con mayor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen actividad alterada de unión de C1q. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invencción con mayor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces mayor actividad de unión a C1q que un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otra realización específica más, los anticuerpos de la invencción con mayor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen citotoxicidad alterada dependiente del complemento. En otra realización específica más, los anticuerpos de la invencción con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen una mejor citotoxicidad dependiente del complemento que un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invencción con mayor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10⁴ veces, al menos 10⁵ veces mayor citotoxicidad dependiente del complemento que la de un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la invencción con afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen una actividad de fagocitosis mejorada con respecto a un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre, según lo determinado por ensayos estándar conocidos por un experto en la técnica o descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invencción con mayor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA tienen al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces mayor actividad de fagocitosis con respecto a un anticuerpo que comprende una región Fc de tipo silvestre.

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

En otra realización específica, la una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la actividad de ADCC del anticuerpo es cualquiera de las mutaciones enumeradas a continuación, en la tabla 4.

Tabla 4.

E333A, K334A
R292L, K334E
V379M
S219Y
V282M
K222N
F243I, V379L
F243L, R255L, E318K
K334I
K334E, T359N, T366S
K288M, K334E
K288N, A330S, P396L

ES 2 897 506 T3

K326E
G316D,A378V,D399E
N315I,V379M,T394M
F243I,V379L,G420V
E293V,Q295E,A327T
Y319F,P352L,P396L
K392T,P396L
K248M
H268N,P396L
K290T, N390I, P396L
K326I, P396L
H268D, P396L
K210M, P396L
L358P, P396L
K288R, T307A, K344E,P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K334N, P396L
V379M, P396L
P227S, P396L
P217S, P396L
K261N, K210M, P396L
Q419H, P396L
K370E, P396L
L242F, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
R255L, P396L
V240A, P396L
T250S, P396L
P247S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
L410H, P396L
Q419L,P396L
V427A, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
E258D, P396L
N384K, P396L
V323I, P396L
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
P244H, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
V305L, P396L
S400F, P396L
V303I, P396L

La invención abarca variantes específicas de la región Fc que se han identificado usando los métodos descritos en el presente documento a partir de una biblioteca de levaduras de mutantes después de que la 2^a-4^a ronda de clasificación se enumeran en la Tabla 5. La Tabla 5 resume los diversos mutantes que se identificaron utilizando los métodos descritos en este documento. Los mutantes se ensayaron usando un ensayo ELISA para determinar la unión a FcγRIIIA y FcγRIIB. Los mutantes también se probaron en un ensayo de ADCC, clonando las variantes de Fc en un anticuerpo ch 4-4-20 usando métodos descritos y ejemplificados en el presente documento. Los ítems en **negrita** se refieren a experimentos en los que el ch 4-4-20 se purificó antes del ensayo de ADCC. La concentración de anticuerpo usada estuvo en el intervalo de 0,5 µg/ml - 1,0 µg/ml. Los anticuerpos que consisten en la mutación o mutaciones identificadas con un asterisco (***) en la Tabla 5 se proporcionan con fines comparativos.

Tabla 5: Mutaciones identificadas en la región Fc

Mutaciones	Dominio	Enlazamiento a FcγRIIIA (ELISA)	Enlazamiento a FcγRIIB (ELISA)	ADCC 4-4-20
Cribado FACS de biblioteca pYD-CH1 con tetramero 3A				
Q347H; A339V*	CH3	↑ 0,5x	NT	
S415I; L251F*	CH2, CH3	↑ 0,5x	↑,75x	0,82
K392R*	CH3	N/C	NT	
D399E; R292L; V185M*	CH1, CH2, CH3	N/C	↑0, 5x	0,65 0,9
K290E; L142P*	CH1, CH2	N/C	NT	
R301C; M252L; S192T*	CH1, CH2	↓,5x	NT	
P291S; K288E; H268L; A141V*	CH1, CH2	↓,5x	NT	
N315I*	CH2	N/C	↑,75x	
S132I*	CH1	N/C	NT	
S383N; N384K; T256N; V262L; K218E; R214I; K205E; F149Y; K133M*	Todos	↑ 0,5x	NT	
S408I; V215I; V125L*	CH1, CH2, CH3	↑ 0,5x	↑,75x	0,62
P396L	CH3	↑1x	↑1x	0,55
G385E; P247H; *	CH2, CH3	↑1x	↑,75x	0,44
P396H*	CH3	↑1x	↑1x	0,58
A162V*	CH1	N/C	NT	
V348M; K334N; F275I; Y202M; K147T*	CH1, CH2, CH3	↑ 0,5x	↑,75x	0,33
H310Y; T289A; G337E*	CH2	↑,5x	NT	
S119F; G371S; Y407V; E258D*	CH1, CH2, CH3	N/C	N/C	0,29
K409R; S166N*	CH1, CH3	N/C	NT	
mutantes dirigidos al sitio <i>in vitro</i>				
R292L*	CH2	NT	NT	0,82
T359N*	CH3	NT	NT	1,06
T366S*	CH3	NT	NT	0,93
E333A, K334A*	CH2	NT	NT	1,41
R292L, K334E*	CH2	NT	NT	1,41; 1,64
R292L, P396L, T359N	CH2, CH3	NT	NT	0,89; 1,15
V379L*	CH3	NT	NT	0,83
K288N*	CH2	NT	NT	0,78
A330S*	CH2	NT	NT	0,52
F243L*	CH2	NT	NT	0,38
E318K*	CH2	NT	NT	0,86
K288N, A330S*	CH2	NT	NT	0,08
R255L, E318K*	CH2	NT	NT	0,82
F243L, E318K*	CH2	NT	NT	0,07
Mutantes en la minibiblioteca de 4-4-20 Mayor unión de FcγRIIIA, menor o ningún cambio para la unión a FcγRIIB				
V379M*	CH3	↑2x	N/C	1,47
S219Y*	Bisagra	↑1x	↓ o N/B	1,28
V282M*	CH2	↑1x	↓ o N/B	1,25; 1
F275I, K334N, V348M*	CH2	↑ 0,5x	N/C	
D401V*	CH3	↑ 0,5x	N/C	
V279L, P395S*	CH2	↑ 1x	N/C	
K222N*	Bisagra	↑ 1x	↓o N/B	1,33; 0,63

ES 2 897 506 T3

K246T, Y319F*	CH2	↑ 1x	N/C	
F243I, V379L*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↓ o N/B	1,86; 1,35
F243L, R255L, E318K*	CH2	↑ 1x	↓ o N/B	1,81; 1,45
K334I*	CH2	↑ 1x	N/C	2,1; 1,97
K334E, T359N, T366S*	CH2, CH3	↑ 1,5x	N/C	1,49; 1,45
K288M, K334E*	CH2	↑ 3x	↓ o N/B	1,61; 1,69
K334E, E380D*	CH2, CH3	↑ 1,5x	N/C	
T256S, V305I, K334E, N390S*	CH2, CH3	↑ 1,5x	N/C	
K334E*	CH2	↑ 2,5x	N/C	1,75; 2,18
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L*	CH2, CH3	↑ 0,5x	N/C	
E233D, K334E*	CH2	↑ 1,5x	N/C	0,94; 1,02
K334E, T359N, T366S, Q386R*	CH2	↑ 1x	N/C	
Mayor unión a FcγIIIA y a FcγRIIB				
K246T, P396H*	CH2, CH3	↑ 1x	↑ 2, 5x	
H268D, E318D*	CH2	↑ 1,5x	↑ 5x	
K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	↑ 5x	↑ 3x	2,34; 1,66; 2,54
Mayor unión a FcγIIIA y a FcγRIIB				
I377F*	CH3	↑ 1,5x	↑ 0,5x	
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M*	CH2, CH3	↑ 1.75x	↑ 1,5x	
P217S, A378V, S408R*	Bisagra, CH3	↑ 2x	↑ 4,5x	
P247L, I253N, K334N*	CH2	↑ 3x	↑ 2,5x	
P247L*	CH2	↑ 0,5x	↑ 4x	0,91; 0,84
F372Y*	CH3	↑ 0,75x	↑ 5,5x	0,88; 0,59
K326E*	CH2	↑ 2x	↑ 3,5x	1,63; 2
K246I, K334N*	CH2	↑ 0,5x	↑ 4x	0,66; 0,6
K320E, K326E*	CH2	↑ 1x	↑ 1x	
H224L*	Bisagra	↑ 0,5x	↑ 5x	0,55; 0,53
S375C, P396L	CH3	↑ 1,5x	↑ 4,5x	
Mayor unión a FcγRIIIA, disminución o ningún cambio de unión a FcγRIIB				
D312E, K327N, I378S*	CH2, CH3	↑ 0,5x	N/C	
K288N, K326N*	CH2	↑ 1x	N/C	
F275Y*	CH2	↑ 3x	N/C	0,64
P247L, N421K*	CH2, CH3	↑ 3x	N/C	2,0
S298N, W381R*	CH2, CH3	↑ 2x	N/C	
D280E, S354F, A431D, L441I*	CH2, CH3	↑ 3x	N/C	0,62
R255Q, K326E*	CH2	↑ 2x	N/C	0,79
K218R, G281D, G385R*	H, CH2, CH3	↑ 3,5x	N/C	0,67
L398V*	CH3	↑ 1,5x	N/C	
P247L, A330T, S440G*	CH2, CH3	↑ 0,75x	↓ 0,25x	
V284A, F372L*	CH2, CH3	1x	N/C	
T335N, P387S, H435Q*	CH2, CH3	1,25x	N/C	

ES 2 897 506 T3

P247L, A431V, S442F*	CH2, CH3	1x	N/C	
Mayor unión a FcγRIIIA y a FcγRIIB P343S, P353L, S375I, S383N*	CH3	↑ 0,5x	↑ 6x	
T394M, V397M*	CH3	↑ 0,5x	↑ 3x	
E216D, E345K, S375I*	H, CH2, CH3	↑ 0,5x	↑ 4x	
K334N, *	CH2	↑ 0,5x	↑ 2x	
K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	↑ 0,5x	↑ 9x	
P247L, E389G*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 9x	
Mayor unión a FcγRIIIA y a FcγRIIB K222N, T335N, K370E, A378V, T394M*	H, CH2, CH3	↑ 1x	↑ 7x	
G316D, A378V, D399E*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 14x	2,24
N315I, V379M, T394M*	CH2, CH3	↑ 1x	↑ 9x	1,37
K290T, G371D, *	CH2, CH3	↑ 0,25x	↑ 6x	
P247L, L398Q*	CH2, CH3	↑ 1,25x	↑ 10x	
K326Q, K334E, T359N, T366S*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 5x	
S400P*	CH3	↑ 1x	↑ 6x	
P247L, I377F*	CH2, CH3	↑ 1x	↑ 5x	
A378V, N390I, V422I*	CH3	↑ 0,5x	↑ 5x	
K326E, G385E*	CH2, CH3	↑ 0,5x	↑ 15x	
V282E, V369I, L406F*	CH2, CH3	↑ 0,5x	↑ 7x	
V397M, T411A, S415N*	CH3	↑ 0,25x	↑ 5x	
T223I, T256S, L406F*	H, CH2, CH3	↑ 0,25x	↑ 6x	
S298N, S407R*	CH2, CH3	↑ 0,5x	↑ 7x	
K246R, S298N, I377F*	CH2, CH3	↑ 1x	↑ 5x	
S407I*	CH3	↑ 0,5x	↑ 4x	
F372Y*	CH3	↑ 0,5x	↑ 4x	
L235P, V382M, S304G, V305I, V323I*	CH2, CH3	↑ 2x	↑ 2x	
P247L, W313R, E388G*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 1x	
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L*	H, CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 6x	
E258D, N384K*	CH2, CH3	↑ 1,25x	↑ 4x	
F241L, E258G*	CH2	↑ 2x	↑ 2,5x	-0,08
K370N, S440N*	CH3	↑ 1x	↑ 3,5x	
K317N, F423* eliminado	CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 7x	0,18
F243I, V379L, G420V*	CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 3,5x	1,35
P227S, K290E*	H, CH2	↑ 1x	↑ 0,5x	
A231V, Q386H, V412M*	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 6x	
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L	H, CH2, CH3	↑ 2x	↑ 4x	
Mayor unión a FcγRIIB pero no a FcγRIIIA				
K334E, E380D*	CH2, CH3	N/C	↑ 4,5x	
T366N*	CH3	N/C	↑ 5x	
P244A, K326I, C367R, S375I, K447T*	CH2, CH3	N/C	↑ 3x	
C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V	H, CH2, CH3	↓ 0,25x	↑ 10x	
Menor unión a FcγRIIIA y a FcγRIIB				
R301H, K340E, D399E*	CH2, CH3	↓ 0,50x	↓ 0,25x	
K414N*	CH3	↓ 0,25x	N/B	
P291S, P353Q*	CH2, CH3	↓ 0,50x	↓ 0,25x	
V240I, V281M*	CH2	↓ 0,25x	↓ 0,25x	
P232S, S304G*	CH2	N/B	N/B	
E269K, K290N, Q311R, H433Y*	CH2, CH3	N/B	N/B	
M352L*	CH3	N/B	N/B	
E216D, K334R, S375I*	H, CH2, CH3	N/B	N/B	
P247L, L406F*	CH2, CH3	N/B	N/B	
T335N, P387S, H435Q*	CH2, CH3	N/B	N/B	

ES 2 897 506 T3

T225S*	CH2	↓ 0,25x	↓ 0,50x	
D399E, M428L*	CH3	↓ 0,50x	↓ 0,50x	
K246I, Q362H, K370E*	CH2, CH3	N/B	↓ 0,50x	
K334E, E380D, G446V*	CH2, CH3	N/B	N/B	
I377N*	CH3	↓ 0,50x	N/B	
V303I, V369F, M428L*	CH2, CH3	N/B	N/B	
L251F, F372L*	CH2, CH3	N/B	N/B	
K246E, V284M, V308A*	CH2, CH3	N/B	N/B	
D399E, G402D*	CH3	N/B	N/B	
D399E, M428L*	CH3	N/B	N/B	
Agotamiento de FcγRIIB /selección de FcγRIIIA: biblioteca de Fc sin modificar.				
E293V, Q295E, A327T*	CH2	↑ 0,4x	↓ o N/B	4,29
Y319F, P352L, P396L	CH2, CH3	↑ 3,4x	↑2x	1,09
K392T, P396L	CH3	↑ 4,5x	↑ 2,5x	3,07
K248M*	CH2	↑ 0,4x	↓ o N/B	4,03
H268N, P396L	CH2, CH3	↑ 2,2x	↑ 4,5x	2,24
Competición en solución de FcγRIIB-G2 40X: biblioteca de P396L				
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D		↑ 3,6x	↑0,1x	3,17
Cribado en equilibrio: monómero de FcγRIIIA 0,8 μM: biblioteca de P396L				
K290T, N390I, P396L	CH2, CH3	↑ 2,8x	↑ 6,1x	1,93
K326I, P396L	CH2, CH3	↑ 2,9x	↑ 5,9x	1,16
H268D, P396L	CH2, CH3	↑ 3,8x	↑13,7x	2,15
Cribado en equilibrio: monómero de FcγRIIIA 0,8 μM: biblioteca de P396L				
K210M, P396L	CH1, CH3	↑ 1,9x	↑ 4,6x	2,02
L358P, P396L	CH3	↑ 1,9x	↑ 4,2x	1,58
K288R, T307A, K344E, P396L	CH2, CH3	↑ 4,1x	↑ 2,3x	3,3
V273I, K326E, L328I, P396L	CH2, CH3	↑ 1,3x	↑10,8x	0,78
K326I, S408N, P396L	CH2, CH3	↑4x	↑ 9,3x	1,65
K334N, P396L	CH2, CH3	↑ 3,1x	↑ 3x	2,43
V379M, P396L	CH3	↑ 1,9x	↑5,6x	2,01
P227S, P396L	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 4x	2,01
P217S, P396L	H, CH3	↑ 1,6x	↑4,5x	2,04
K261N, K210M, P396L	CH2, CH3	↑ 2x	↑ 4,2x	2,06
Cribado cinético: 0,8 μM, 1' con FcγRIIIA 8 μM frio: biblioteca de P396L				
El termino es M, P396L	CH3	↑ 1,9x	↑ 7,2x	3,09
Q419H, P396L	CH3	↑ 2x	↑ 6,9x	2,24
K370E, P396L	CH3	↑2x	↑6,6x	2,47
L242F, P396L	CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 4,1x	2,4
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	CH2, CH3	↑ 1,6x	↑5,4x	3,59
R255L, P396L	CH2, CH3	↑ 1,8x	↑ 6x	2,79
V240A, P396L	CH2, CH3	↑ 1,3x	↑ 4,2x	2,35
T250S, P396L	CH2, CH3	↑ 1,5x	↑6,8x	1,60
P247S, P396L	CH2, CH3	↑ 1,2x	↑ 4,2x	2,10
K290E, V369A, T393A, P396L	CH2, CH3	↑ 1,3x	↑ 6,7x	1,55
K210N, K222I, K320M, P396L	H, CH2, CH3	↑ 2,7x	↑ 8,7x	1,88
L410H, P396L	CH3	↑ 1,7x	↑ 4,5x	2,00
Q419L, P396L	CH3	↑ 2,2x	↑ 6,1x	1,70
V427A, P396L	CH3	↑ 1,9x	↑4,7x	1,67
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L	H, CH2, CH3	↑2x	↑ 7x	1,54

E258D, P396L	CH2, CH3	↑ 1,9x	↑ 4,9x	1,54
N384K, P396L	CH3	↑ 2,2x	↑ 5,2x	1,49
V323I, P396L	CH2, CH3	↑ 1,1x	↑ 8,2x	1,29
K246N, Q419R, P396L	CH2, CH3	↑ 1,1x	↑ 4,8x	1,10
P217A, T359A, P396L	H, CH2, CH3	↑ 1,5x	↑ 4,8x	1,17
P244H, P396L	CH2, CH3	↑ 2,5x	↑ 4x	1,40
V215I, K290V, P396L	H, CH2, CH3	↑ 2,2x	↑ 4,6x	1,74
F275L, Q362H, N384K, P396L	CH2, CH3	↑ 2,2x	↑ 3,7x	1,51
V305L, P396L	CH2, CH3	↑ 1,3x	↑ 5,5x	1,50
S400F, P396L	CH3	↑ 1,5x	↑ 4,7x	1,19
Cribado cinético: 0,8 µM, 1' con FcγRIIIA 8 µM frio: biblioteca de P396L				
V303I, P396L	CH3	↑ 1,1x	↑ 4x	1,01
Agotamiento de FcγRIIB selección en fase sólida de FcγRIIIA 158V: Biblioteca sin modificar				
A330V, H433Q, V427M*	CH2, CH3	NT	NT	NT
V263Q, E272D, Q419H*	CH2, CH3	NT	NT	NT
N276Y, T393N, W417R*	CH2, CH3	NT	NT	NT
V282L, A330V, H433Y, T436R*	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, Q419H*	CH2, CH3	NT	NT	NT
V284M, S298N, K334E, R355W*	CH2, CH3	NT	NT	NT
A330V, G427M, K438R*	CH2, CH3	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E, K360R*	CH2, CH3	NT	NT	NT
K222E, V263Q, S298N*	CH2	NT	NT	NT
V263Q, E272D*	CH2	NT	NT	NT
R292G*	CH2	NT	NT	NT
S298N*	CH2	NT	NT	NT
E233G, P247S, L306P*	CH2	NT	NT	NT
D270E*	CH2	NT	NT	NT
S219T, T225K, D270E*	CH2	NT	NT	NT
K326E, A330T*	CH2	NT	NT	NT
E233G*	CH2	NT	NT	NT
S254T, A330V, N361D, P243L*	CH2, CH3	NT	NT	NT
Agotamiento de FcγRIIB selección en fase sólida de FcγRIIIA 158F: Biblioteca sin modificar				
158F por FACS hasta 0,2%				
V284M, S298N, K334E, R355W R416T*	CH2, CH3	NT	NT	

5 En realizaciones preferidas, la invención proporciona anticuerpos modificados con regiones Fc variantes, que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, cuyas modificaciones de uno o más aminoácidos aumentan la afinidad de la molécula por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Dichos anticuerpos incluyen moléculas de IgG que contienen de forma natural regiones de unión a FcγR (por ejemplo, región de unión de FcγRIIIA y/o FcγRIIB), o anticuerpos que han sido modificados para contener una región de unión de FcγR (por ejemplo, región de unión de FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Los anticuerpos modificados de la invención incluyen cualquier anticuerpo que se una, preferiblemente, de forma inmuno-específica, es decir, compita con la unión no específica determinada por inmunoensayos bien conocidos en la técnica para analizar la unión específica de antígeno-anticuerpo, un antígeno y que contiene una región de unión de FcγR (por ejemplo, una región de unión de FcγRIIIA y/o FcγRIIB). Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, bispecíficos, multispecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos por disulfuro y fragmentos que contienen un dominio VL o VH o incluso una región determinante complementaria (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, modificado para contener o fusionarse a una región de unión de FcγR.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden porciones de una región Fc. Como se usa en este documento, el término "porción de una región Fc" se refiere a fragmentos de la región Fc, preferiblemente una porción con actividad efectora y/o actividad de unión a FcγR (o una región comparable de un mutante que carece de tal actividad). El fragmento de una región Fc puede variar en tamaño desde 5 aminoácidos hasta la región Fc completa

menos un aminoácido. A una porción de una región Fc puede faltar hasta 10, hasta 20, hasta 30 aminoácidos del terminal N o terminal C.

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

10 Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal, incluidos aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de humano, roedor (por ejemplo, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo. Como se usa en este documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.939.598 de Kucherlapati et al.

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

20 Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que se modifican de otra manera, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una al antígeno y/o genere una respuesta antiidiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

25 Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante derivada de una inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, Science, 229: 1202, 1985; Oi et al., BioTechniques, 4: 214 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989; patentes de los Estados Unidos Nos 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de especies no humanas y regiones marco y dominios constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos del marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos del marco para identificar los residuos marco importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos de la inusuales del marco en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, Queen et al., patente de los Estados Unidos N° 5.585.089; Riechmann et al., Nature, 332: 323, 1988. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de los Estados Unidos Nos 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering, 7 (6): 805-814, 1994; Roguska et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969-973, 1994), y barajado de cadenas (patente de los Estados Unidos No. 5.565.332).

35 Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluidos los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

40 También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para obtener una descripción general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995. Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por

ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente europea No. 0 598 877; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, se pueden contratar empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

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

La invención abarca anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados modificados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc, mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido, cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por Fc γ R11A, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. En otra realización, la invención se refiere a anticuerpos terapéuticos humanos o humanizados modificados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumores) en la región Fc, mediante la modificación de al menos un residuo de aminoácido, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc por Fc γ R11A y disminuye además la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. Los anticuerpos terapéuticos modificados pueden tener además una función efectora mejorada, por ejemplo, actividad de ADCC mejorada, actividad de fagocitosis, etc., según se determina mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización específica, la invención abarca un anticuerpo monoclonal humanizado modificado específico para el protooncogén Her2/neu (por ejemplo, anticuerpo humanizado Ab4D5 como se describe en Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-9) mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por Fc γ R11A, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal Her2/neu humanizado también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B. En otra realización específica más, los anticuerpos monoclonales humanizados modificados específicos para Her2/neu pueden tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano de ratón modificado, 2H7 mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por Fc γ R11A, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo monoclonal anti-CD20, 2H7 también puede disminuir más la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B. En aún otra realización específica más, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 modificado, 2H7, puede tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento.

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo anti-Fc γ R11B modificado que incluye, pero no se limitan a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/403,266 presentada el 12 de agosto de 2002 y la solicitud de los Estados Unidos No. 10/.643,857 presentada el 14 de agosto de 2003, con número de expediente de abogado 011183-010-999, mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por Fc γ R11A, en la que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 por leucina. Ejemplos de anticuerpos anti-Fc γ R11B que pueden modificarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene el número de acceso ATCC PTA-4591 y el 3H7 que tiene el número de acceso ATCC PTA-4592 (depositado en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 02209-2011). En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-Fc γ R11B también puede disminuir aún más la afinidad de la región Fc por Fc γ R11B. En otra realización específica, el anticuerpo anti-Fc γ R11B modificado puede tener además una función efectora mejorada según lo determinado por ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal 2B6 comprende una modificación en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 243 con isoleucina, en la posición 379 con leucina y en la posición 420 con valina (MgFc29); o una sustitución en la posición 392 con treonina y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina y en la posición 402 con aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 410 con histidina y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con isoleucina y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59) (véase la Tabla 5).

5.1.1 Conjugados de polipéptidos y anticuerpos

Los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o una porción del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, pero puede ocurrir a través de secuencias enlazadoras.

Además, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes pueden conjugarse con un agente terapéutico o una fracción de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o las fracciones de fármacos no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina de la difteria, ricina, gelonina y proteína antiviral de hierba carmín, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, no limitados a, α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I como se describe en la publicación PCT No. WO 97/33899), AIM II (véase, la publicación PCT No. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., *J. Immunol.*, 6: 1567-1574, 1994) y VEGI (Publicación PCT No. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

Los anticuerpos de la invención se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), pero no se limitan a, muchos de los cuales están comercialmente disponible. Como se describe en Gentz et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., *Cell*, 37: 767 1984) y la etiqueta "flag" (Knappik et al., *Biotechniques*, 17 (4): 754-761, 1994).

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominados colectivamente "barajado de ADN"). Puede emplearse barajado de ADN para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Véanse, en general, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24: 308. Los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes, o los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención, pueden alterarse adicionalmente sometiendo a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente invención también abarca anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes (es decir, anticuerpos, polipéptidos) conjugadas con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la semivida en suero y/o dirigirse a un subconjunto particular de células. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para diagnóstico, por ejemplo, para controlar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar acoplando los anticuerpos de la invención a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a los anticuerpos de la invención o indirectamente, a través de un compuesto intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como compuestos de diagnóstico. Dicho diagnóstico y detección se pueden realizar acoplando los anticuerpos de la invención a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos protésicos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a,

5 luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; material radiactivo tal como, pero no se limitan a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{8}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones mediante diversas tomografías por emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

10 Los anticuerpos de la invención que comprenden una región Fc variante se pueden conjugar con una fracción terapéutica tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisplatino cisdiclorodiamina platino (II) (DDP)), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina)) bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

25 Además, un anticuerpo de la invención se puede conjugar con fracciones terapéuticas tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véanse los ejemplos anteriores de materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4: 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10: 553; y Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26: 943-50.

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

45 En una realización, cuando el anticuerpo de la invención es un anticuerpo que comprende una región Fc variante, puede administrarse con o sin una fracción terapéutica conjugado con él, administrarse solo o en combinación con un factor o factores citotóxicos y/o citocina o citocinas para su uso como tratamiento terapéutico. Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como lo describe Segal en la patente de los Estados Unidos No. 4.676.980. Los anticuerpos de la invención también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.2 Cribado de moléculas con regiones variantes de Fc para una unión de FcγRIII mejorada y caracterización de las mismas

55 El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad de FcγRIIIA mejorada) se puede realizar usando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos bioquímicos, preferiblemente en una manera de alto rendimiento. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar la interacción Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR, que incluye, pero no se limitan a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis de equilibrio. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA mejorada) se puede realizar utilizando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una forma de alto rendimiento. Los ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR tales como las descritas en el presente documento en la Sección 5.2.6. Los ejemplos no limitantes de funciones de células

efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (por ejemplo, afinidad por FcγRIIIA mejorada) se puede realizar utilizando la tecnología de presentación en levadura como se describe en este documento en combinación con uno o más ensayos bioquímicos en combinación o en paralelo con uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una forma de alto rendimiento.

El término "unión específica" de una región Fc a un FcγR se refiere a una interacción de la región Fc y un FcγR particular que tiene una constante de afinidad de al menos aproximadamente 150 nM, en el caso de FcγRIIIA monomérico y al menos aproximadamente 60 nM en el caso de FcγRIIB dimérico según se determina usando, por ejemplo, un ensayo ELISA o un ensayo de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, un BIAcore^{MR}). La constante de afinidad de una región Fc por el FcγRIIIA monomérico puede ser 150 nM, 200 nM o 300 nM. La constante de afinidad de una región Fc por FcγRIIB dimérico puede ser 60 nM, 80 nM, 90 nM o 100 nM. El FcγRIIB dimérico para usar en los métodos descritos en el presente documento puede generarse usando métodos conocidos por un experto en la técnica. Típicamente, la región extracelular de FcγRIIB está unida covalentemente a un polipéptido heterólogo que es capaz de dimerizar, de modo que la proteína de fusión resultante es un dímero, por ejemplo, véase la solicitud de los Estados Unidos No. 60/439,709 presentada el 13 de enero de 2003 (expediente de abogado No. 11183-005-888). Una interacción específica generalmente es estable en condiciones fisiológicas, incluidas, por ejemplo, las condiciones que ocurren en un individuo vivo, tal como un ser humano u otro vertebrado o invertebrado, así como las condiciones que ocurren en un cultivo celular, las condiciones que se usan para mantener y cultivar células de mamífero o células de otro organismo vertebrado o de un organismo invertebrado.

El cribado e identificación de moléculas que comprenden regiones Fc variantes y afinidades por FcγR alteradas puede comprender: presentar la molécula que comprende una región Fc variante en la superficie de la levadura; y caracterizar la unión de la molécula que comprende la región Fc variante a un FcγR (uno o más), usando un ensayo bioquímico para determinar la interacción Fc-FcγR, preferiblemente, un ensayo basado en ELISA. Una vez que la molécula que comprende una región Fc variante se ha caracterizado por su interacción con uno o más FcγR y se ha determinado que tiene una afinidad alterada por uno o más FcγR, mediante al menos un ensayo bioquímico, por ejemplo, un ensayo ELISA, la molécula puede modificarse en una inmunoglobulina completa, usando métodos de tecnología de ADN recombinante estándar conocidos en la técnica, y la inmunoglobulina que comprende la región Fc variante expresada en células de mamífero para una caracterización bioquímica adicional. El anticuerpo en el que se introduce una región Fc variante de la invención (por ejemplo, reemplazando la región Fc de la inmunoglobulina) puede ser cualquier inmunoglobulina, incluidos, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multispecíficos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. Puede introducirse una región Fc variante en una inmunoglobulina específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno del cáncer. El anticuerpo en el que se introduce una región Fc variante de la invención puede unirse específicamente a un antígeno del cáncer o tumoral, por ejemplo, que incluye, pero no se limita a, antígeno pancarcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7 (4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, *Cancer Res.* 51 (2): 468-475), fosfato ácido prostático (Tailor et al., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18 (16): 4928), antígeno prostático específico (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160 (2): 903-910; Israeli et al., 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin et al., 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81 (6): 445-446), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl et al., 1990, *J. Exp. Med.* 171 (4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, *Cancer* 59: 55-63; Mittelman et al., 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno 38.13 del linfoma de Burkitt, CD19 (Ghetie et al., 1994, *Blood* 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff et al., 1994, *Blood* 83: 435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), el gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373-380), el gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036-1044), el gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, *Cancer Res.* 53: 5244-5250), tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus que incluyen virus tumorales de ADN del antígeno T y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno-alfa-fetoproteína oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal tumoral de vejiga (Hellstrom et al., 1985, *Cancer Res.* 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, *Cancer Res.* 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, *J. of Immun.* 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), antígeno de linfocito humano maligno APO-1 (Bernhard et al., 1989, *Science* 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales, el antígeno I del endodermo primario que se encuentra en los eritrocitos adultos, embriones preimplantados, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas

gástricos, M18, M39 encontrados en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D156-22 encontrados en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor del EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 encontrado en el receptor del EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19,9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 encontradas en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones en estadio de 4 a 8 células. El antígeno puede ser un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase, Edelson, 1998, The Cancer Journal 4: 62).

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

En otra realización específica, la invención abarca un anticuerpo anti-FcγRIIB modificado que incluye, pero no se limitan a, cualquiera de los anticuerpos descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/403,266 presentada el 12 de agosto de 2002 y la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2004. -0185045 (patente de los Estados Unidos No. 7.425.620), mediante modificación (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) de al menos un residuo de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc por FcγRIIIA y/o FcγRIIA. Ejemplos de anticuerpos anti-FcγRIIB que pueden modificarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento son el anticuerpo monoclonal 2B6 que tiene el número de acceso ATCC PTA-4591 y 3H7 que tiene el número de acceso ATCC PTA-4592. En otra realización específica, la modificación del anticuerpo anti-FcγRIIB también puede disminuir adicionalmente la afinidad de la región Fc por FcγRIIB. En otra realización específica más, el anticuerpo anti-FcγRIIB modificado puede tener además una función efectora mejorada según se determina mediante ensayos estándar conocidos en la técnica y descritos y ejemplificados en el presente documento. En algunas realizaciones, se introduce una región Fc variante de la invención en un anticuerpo monoclonal terapéutico específico para un antígeno del cáncer o un receptor de la superficie celular que incluye, pero no se limitan a, Erbitux^{MR} (también conocido como IMC-C225) (ImClone Systems Inc.), un anticuerpo monoclonal quimerizado contra EGFR; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX® (dacizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención del rechazo agudo de aloinjerto renal. Otros ejemplos son un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Celltech, Reino Unido); PRO542 que es un anticuerpo gp120 anti-VIH fusionado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); C14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); OVAREX^{MR}, que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); PANOREX^{MR}, que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-IA murino (Glaxo Wellcome/Centocor); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN^{MR}, que es un anticuerpo de integrina anti-αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195, que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN^{MR}, que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE^{MR}, que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); Smart ID10, que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (Protein Design Lab); ONCOLYM^{MR} (Lym-1) es un anticuerpo DR anti-HLA murino radiomarcado (Techniclone); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genetech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN^{MR} es un anticuerpo anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un IgG anti-CD3 humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF-α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti-α4β7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA^{MR} es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN^{MR} es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo anti-CD64 humano (FcγR) (Medarex/Centeon); rhuMab-E25 es un anticuerpo IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharm); ABX-CBL es un anticuerpo IgM anti CD-147 murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo IgG anti-CD2 de rata

(Medimmune/BioTransplant); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a anti-CD3 murino (ortho Biotech); SIMULECT^{MR} es un anticuerpo IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo IgG anti- β_2 -integrina humanizado (LeukoSite); anti-LFA-1 es un F(ab')₂ anti-CD18 murino (Pasteur-Merieux/Immunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β_2 humano (Cambridge Ab Tech); y Corsevin M es un anticuerpo anti-Factor VII quimérico (Centocor).

En las regiones Fc variantes de la invención un anticuerpo se puede caracterizar adicionalmente usando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una forma de alto rendimiento. Alternativamente, las regiones Fc variantes de la invención no se introducen en una inmunoglobulina y se caracterizan además usando uno o más ensayos bioquímicos y/o uno o más ensayos funcionales, preferiblemente de una forma de alto rendimiento. El uno o más ensayos bioquímicos pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para identificar interacciones Fc-Fc γ R, que incluyen, pero no se limitan a, un ensayo ELISA y un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial para determinar los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, por ejemplo, ensayo BIAcore. El uno o más ensayos funcionales puede ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por Fc γ R como las conoce un experto en la técnica o como se describe en el presente documento. Las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes pueden ensayarse en un ensayo ELISA para la unión a uno o más Fc γ R, por ejemplo, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIA; seguido de uno o más ensayos de ADCC. Las inmunoglobulinas que comprenden las regiones Fc variantes pueden ensayarse adicionalmente usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmón superficial son bien conocidos en la técnica, y se comentan adicionalmente en la Sección 5.2.7, y se ejemplifican en el presente documento en el Ejemplo 6.8.

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

La región Fc variante de la invención se une a Fc γ RIIIA con una afinidad más alta que una región Fc de tipo silvestre según se determina en un ensayo ELISA. Lo más preferiblemente, una región Fc variante de la invención se une a Fc γ RIIIA con una mayor afinidad y se une a Fc γ RIIB con una afinidad menor que una región Fc de tipo silvestre según se determina en un ensayo ELISA. La región Fc variante puede unirse a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad al menos 2 veces mayor, al menos 4 veces mayor, más preferiblemente al menos 6 veces mayor, lo más preferiblemente al menos 8 a 10 veces mayor que una región Fc de tipo silvestre se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA y se une a Fc γ RIIB con una afinidad al menos 2 veces menor, al menos 4 veces menor, más preferiblemente al menos 6 veces menor, más preferiblemente al menos 8 a 10 veces menor que una región Fc de tipo silvestre se une a Fc γ RIIB según se determina en un ensayo ELISA.

La inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes se puede analizar en cualquier punto usando un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore, para definir los parámetros cinéticos de la interacción Fc-Fc γ R, usando métodos descritos en este documento y conocidos por aquellos expertos en la técnica. Preferiblemente, la K_d de una región Fc variante de la invención para unirse a un Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA monomérico según se determina mediante análisis BIAcore es aproximadamente 100 nM, preferiblemente aproximadamente 70 nM, lo más preferiblemente aproximadamente 40 nM; y la K_d de la región Fc variante de la invención para la unión a un Fc γ RIIB dimerico es aproximadamente 80 nM, aproximadamente 100 nM, más preferiblemente aproximadamente 200 nM.

La inmunoglobulina que comprende las regiones Fc variantes puede caracterizarse adicionalmente en un modelo animal para la interacción con un Fc γ R. Los modelos animales preferidos para su uso en los métodos descritos en este documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan Fc γ R humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en la patente de los Estados Unidos No. 5.877.397. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, ratones desnudos con inactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIIA humana; ratones desnudos con inactivación de Fc γ RIIA que portan Fc γ RIIA humana; ratones desnudos con inactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIB humano y Fc γ RIIIA humano; ratones desnudos con inactivación de Fc γ RIIIA que portan Fc γ RIIB humano y Fc γ RIIA humano.

5.2.1 Ensayo de unión de Fc γ R-Fc

Se desarrolló un ensayo de unión de Fc γ R-Fc para determinar la unión de los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes a Fc γ R, lo que permitió la detección y cuantificación de la interacción, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para Fc γ RIIB y

FcγRIIIA. El método implica la formación de un complejo FcγR que tiene una avidéz mejorada por una región Fc, en relación con un FcγR no complejado. El complejo molecular preferido es un inmunocomplejo tetramérico, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida operativamente al extremo terminal C de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una relación molar para formar un complejo FcγR tetramérico (preferiblemente en una relación molar de 5:1). La proteína de fusión puede biotinilarse enzimáticamente, usando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un residuo de lisina en la secuencia de AVITAG de 15 aminoácidos. El 85% de la proteína de fusión puede biotinilarse, según se determina mediante métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen pero no se limitan al ensayo de desplazamiento de estreptavidina. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas pueden mezclarse con SA-PE en una relación molar de FcγR soluble biotinilada IX SA-PE: 5X para formar un complejo FcγR tetramérico.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos que comprenden regiones Fc se unen a los complejos FcγR tetraméricos, formados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, con al menos una afinidad 8 veces mayor que el FcγR monomérico no complejado. La unión de polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos FcγR tetraméricos puede determinarse usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

En el presente documento se describe el uso de los inmunocomplejos formados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o sin células.

Por conveniencia, los reactivos se pueden proporcionar en un kit de ensayo, es decir, una combinación empaquetada de reactivos para ensayar la capacidad de moléculas que comprenden regiones Fc variantes para unirse a complejos tetraméricos FcγR. También se contemplan otras formas de complejos moleculares para su uso en la determinación de interacciones Fc-FcγR para su uso en los métodos descritos en este documento, por ejemplo, proteínas de fusión formadas como se describe en la solicitud provisional de los Estados Unidos 60/439,709, presentada el 13 de enero de 2003.

5.2.2 Mutagénesis y construcción de bibliotecas de presentación en levadura

Se produce una biblioteca inicial de moléculas que comprenden regiones Fc variantes usando cualquier técnica de mutagénesis aleatoria conocida en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que las variantes de la secuencia de aminoácidos de las regiones Fc pueden obtenerse mediante cualquier técnica de mutagénesis conocida por los expertos en la técnica. Algunas de estas técnicas se describen brevemente en el presente documento, sin embargo, se reconocerá que los procedimientos alternativos pueden producir un resultado equivalente. Los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes pueden prepararse mediante PCR propensa a errores como se ejemplifica en el Ejemplo 6, más adelante (véase Leung et al., 1989, *Technique*, 1:11). Se prefiere especialmente tener tasas de error de 2-3 pb/Kb para su uso en los métodos descritos en este documento. Usando PCR propensa a errores, se puede obtener una frecuencia de mutación de 2-3 mutaciones/kb.

La mutagénesis se puede realizar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en el arte que incluyen, pero no se limitan a, sintetizar un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones dentro de la secuencia de la región Fc de un anticuerpo o un polipéptido que comprende una región Fc (por ejemplo, el dominio CH2 o CH3) que se va a modificar. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como una cantidad suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de eliminación que se atraviesa. Normalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 nucleótidos o más de longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o más residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando. Se pueden usar varios de tales cebadores que introducen una variedad de mutaciones diferentes en una o más posiciones para generar una biblioteca de mutantes.

La técnica de mutagénesis específica del sitio es bien conocida en el arte, como se ejemplifica en diversas publicaciones (véase, por ejemplo, Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154: 367-82, 1987). En general, la mutagénesis dirigida al sitio se realiza obteniendo primero un vector monocatenario o fusionando dos cadenas de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada, generalmente de forma sintética. A continuación, este cebador se hibrida con el vector monocatenario y se somete a enzimas que polimerizan el ADN, tales como la ADN polimerasa T7, para completar la síntesis de la cadena portadora de la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia no mutada original y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex se usa luego para transformar o transfectar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada. Como se apreciará, la técnica emplea típicamente un vector de fago que existe tanto en forma

monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos bicatenarios también se emplean de forma rutinaria en la mutagénesis dirigida al sitio que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

Alternativamente, el uso de PCR^{MR} con enzimas termoestables disponibles comercialmente tales como Taq ADN polimerasa puede usarse para incorporar un cebador oligonucleotídico mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que luego puede clonarse en un vector de clonación o expresión apropiado. Véase, por ejemplo, Tomic et al., *Nucleic Acids Res.*, 18 (6): 1656, 1987, y Upende et al., *Biotechniques*, 18 (1): 29-30, 32, 1995, para procedimientos de mutagénesis mediada por PCR^{MR}. También se puede usar PCR^{MR} que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que luego puede clonarse en un vector de clonación o expresión apropiado (véase por ejemplo, Michael, *Biotechniques*, 16 (3): 410-2, 1994).

Otro método para preparar variantes para su uso en la invención es la mutagénesis en casete basada en la técnica descrita por Wells et al., (1985, *Gene*, 34: 315). El material de partida es el plásmido que comprende el ADN deseado que codifica la proteína a mutar (por ejemplo, el ADN que codifica un polipéptido que comprende una región Fc). Se identifican el codón o codones de la secuencia de ADN que se va a mutar; debe haber un sitio de endonucleasa de restricción único en cada lado del sitio o sitios de mutaciones identificados. Si no existe tal sitio de restricción, puede generarse mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Una vez que los sitios de restricción se han introducido en el plásmido, el plásmido se corta en estos sitios y se linealiza. Un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación se sintetiza usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. El oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete está diseñado para tener extremos 3' y 5' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de modo que pueda ligarse directamente al plásmido.

Pueden usarse otros métodos conocidos por los expertos en la técnica para producir variantes de secuencia de la región Fc de un anticuerpo o polipéptidos que comprenden una región Fc. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican la secuencia de aminoácidos del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento del mismo pueden tratarse con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

Una vez que se produce una biblioteca mutante de acuerdo con los métodos descritos, la biblioteca mutagenizada se transforma en una cepa de levadura, preferiblemente EBY100 (Invitrogen), *MATa ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4 :: HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL :: GAL-AGA1* usando un protocolo estándar de transformación con acetato de litio conocido por los expertos en la técnica (ref).

Un experto en la técnica apreciará que una vez que los anticuerpos de la invención con las propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácido, dicha modificación mejora la afinidad de la región Fc variante para FcγRIIIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc de tipo silvestre) se han identificado (véase la sección 5.1 y la Tabla 2) de acuerdo con los métodos descritos en este documento, otras moléculas (es decir, anticuerpos terapéuticos) se pueden modificar usando técnicas estándar de ADN recombinante y cualquier técnica de mutagénesis conocida, como se describe en esta sección para producir moléculas modificadas que portan los sitios de mutación identificados.

5.2.3 Presentación en la superficie de levadura

El método preferido para cribar e identificar moléculas que comprenden regiones Fc variantes con afinidades por FcγR alteradas (es decir, afinidad por FcγRIIIA mejorada y/o FcγRIIA) es la tecnología de presentación en superficie de levadura (para revisión, véase Boder y Wittrup, 2000, *Methods in Enzymology*, 328: 430-444) que aborda la deficiencia en la técnica anterior para cribar interacciones de unión de proteínas extracelulares modificadas postraduccionalmente. Específicamente, la presentación en la superficie de levadura es un método genético mediante el cual los polipéptidos que comprenden mutantes de Fc se expresan en la pared celular de la levadura en una forma accesible para interactuar con FcγR. La presentación en la superficie de la levadura de los anticuerpos de la invención que contienen Fc mutante puede realizarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véanse las patentes de los Estados Unidos Nos 6.423.538; 6.114.147; y 6.300.065. See Boder et al., 1997 *Nat. Biotechnol.*, 15: 553-7; Boder et al., 1998 *Biotechnol. Prog.* 14: 55-62; Boder et al., 2000 *Methods Enzymol.*, 328: 430-44; Boder et al., 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2000, 97: 10701-5; Shusta et al., 1998 *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16: 773-7; Shusta et al., 1999 *J. Mol. Biol.*, 292: 949-56; Shusta et al., 1999 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 117-22; Shusta et al., 2000 *Nat. Biotechnol.*, 18: 754-9; Wittrup et al., 1994 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 745: 321-30; Wittrup et al., 1994 *Cytometry*, 16: 206-13; Wittrup, 1995 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6: 203-8; Wittrup, 1999 *Trends Biotechnol.*, 17: 423-4; Wittrup, 2000 *Nat. Biotechnol.*, 18: 1039-40; Wittrup, 2001 *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12: 395-9.

En el presente documento se describen métodos para construir una biblioteca de mutantes de Fc en levadura para presentar moléculas que comprenden regiones Fc, que se han mutado como se describe en la Sección 5.2.2. Preferiblemente, las bibliotecas de mutantes de Fc para usar en los métodos descritos en este documento contienen al menos 10⁷ células, hasta 10⁹ células. Un ejemplo de método para construir una biblioteca de Fc para usar en los

métodos descritos en este documento comprende lo siguiente: los ácidos nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc se clonan en el sitio de clonación múltiple de un vector derivado de un vector de replicación de levadura, por ejemplo, pCT302; de manera que los ácidos nucleicos que codifican Fc se expresan bajo el control del promotor inducible por galactosa GAL1 y en marco con una secuencia de nucleótidos que codifica Aga2p, la proteína de la pared celular aglutinina de apareamiento. Los ácidos nucleicos que codifican moléculas que comprenden regiones Fc pueden clonarse en el terminal C en la región de codificación de Aga2p, de manera que se codifica una proteína de fusión Aga2p de la región Fc. Una proteína de fusión que comprende la proteína Aga2p y polipéptidos que comprenden regiones Fc se secretarán extracelularmente y se presentarán en la pared celular mediante enlace disulfuro a la proteína Aga1p, una proteína integral de la pared celular, usando el constructo preferido. Los constructos pueden comprender además secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítipo. Puede usarse cualquier secuencia de codificación de nucleótidos de la etiqueta de epítipo conocida por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias de nucleótidos que codifican hemaglutinina (HA), c-myc Xpress TAG, His-TAG o V5TAG. La presencia de la proteína de fusión en la superficie de la célula de levadura puede detectarse usando análisis de FACS, microscopía de fluorescencia confocal o métodos de inmunotinción estándar, todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica. La presencia de las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura puede detectarse utilizando anticuerpos monoclonales específicos de Fc (específicos de CH3), incluidos, pero no se limitan a, el anticuerpo monoclonal específico de Fc de IgG1, HP6017 (Sigma), JL512 (Immunotech) y cualquier anticuerpo descrito en Partridge et al., 1986, Molecular Immunology, 23 (12): 1365-72. La presencia de las proteínas de fusión Fc puede detectarse mediante marcaje inmunofluorescente de etiquetas de epítipo usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Es particularmente útil en los métodos descritos en este documento, usar secuencias de nucleótidos que codifican etiquetas de epítipo para flanquear los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión Fc, como control interno, para detectar si las proteínas de fusión se presentan en la pared celular en una forma parcialmente proteolizada.

5.2.4 Cribado de bibliotecas de presentación en levadura

También se describe el cribado de las bibliotecas de presentación en levadura utilizando ensayos inmunológicos que incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en células, ensayos basados en solución y ensayos basados en fase sólida.

También se describe la identificación de mutantes de Fc con afinidades por FcγR alteradas usando métodos de maduración por afinidad que son conocidos por los expertos en la técnica. Brevemente, la maduración por afinidad crea nuevos alelos recombinando aleatoriamente mutaciones individuales presentes en una biblioteca de mutantes, véase, por ejemplo, Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896; Stemmer et al., 1994 Nature, 370: 389-91. Se ha utilizado con éxito para aumentar la afinidad de anticuerpos, receptores de células T y otras proteínas. También se describe el uso de mutaciones que muestran un aumento de la unión de FcγR como línea de base para construir nuevas bibliotecas mutantes con fenotipos mejorados. Usando los métodos descritos en el presente documento, se puede seleccionar una población de mutantes de Fc de IgG1 enriquecidos por la presentación en la superficie de la levadura para mayor unión a un FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA. Después de la preparación del ADN, las regiones Fc pueden amplificarse mediante PCR usando cebadores flanqueantes que amplifican selectivamente la región mutada de Fc, que es de aproximadamente 700 pb usando métodos conocidos por un experto en la técnica y ejemplificados o descritos en el presente documento. Por lo tanto, se pueden construir nuevos mutantes reorganizando las mutaciones en la región Fc, por ejemplo, mediante el tratamiento con DNAsal del ADN amplificado y el aislamiento de fragmentos usando métodos tales como los descritos por Stemmer et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-51. A continuación, los fragmentos se pueden volver a ligar, amplificar por PCR con cebadores anidados y clonar en el vector de presentación en levadura, por ejemplo, pYD1 usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. La biblioteca recombinada se puede volver a seleccionar en el cribado de presentación de Fc en levadura. A medida que la K_D disminuye, por debajo de 10 nM, se pueden establecer condiciones para permitir mayores aumentos en la afinidad basándose en la reducción de la constante de disociación del ligando de FcγRIIIA del receptor Fc utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en Boder et al., 1998, Biotechnol. Prog. 14: 55-62. También se describe un cribado cinético de la biblioteca de levaduras. Puede establecerse un cribado cinético marcando las células que presentan Fc hasta la saturación con un ligando marcado, por ejemplo, un ligando fluorescente seguido de incubación con un exceso de ligando no marcado durante un período predeterminado. Después de la terminación de la reacción mediante la adición de un exceso de tampón (por ejemplo, IX PBS, 0,5 mg/ml de BSA) las células se analizarán mediante FACS y se establecerán cuadrantes de clasificación para la selección. Después de cada ronda de enriquecimiento, los mutantes individuales pueden probarse para determinar los aumentos de afinidad y secuenciarse para determinar la diversidad. El proceso de recombinación *in vitro* se puede repetir. El proceso *in vitro* puede repetirse al menos 3 veces.

La selección de las variantes de Fc de la invención se puede realizar usando cualquier FcγR que incluye, pero no se limita a, variantes polimórficas de FcγR. La selección de las variantes de Fc puede realizarse usando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contiene una fenilalanina en la posición 158. La selección de las variantes de Fc puede realizarse usando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contiene una valina en la posición 158. FcγRIIIA 158V presenta una mayor afinidad por IgG1 que 158F y una mayor actividad de ADCC (véase, por ejemplo, Koene et al., 1997, Blood, 90: 1109-14; Wu et al., 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059-70); de hecho, este residuo interactúa directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como se ha demostrado recientemente mediante estudios de

cocrystalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, por ejemplo, Sonderman et al., 2000, Nature, 100: 1059-70. Los estudios han demostrado que, en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos tienen una eficacia mejorada en pacientes homocigotos con FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos con FcγRIIIA158V en comparación con pacientes homocigotos con FcγRIIIA 158F (véase, por ejemplo, Cartron et al., 2002 Blood, 99 (3): 754-8). Aunque sin pretender unirse a un mecanismo de acción particular, la selección de variantes de Fc de la invención con el alotipo FcγRIIIA 158F puede proporcionar variantes que una vez modificadas en anticuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigóticos con FcγRIIIA 158F.

También se describe el cribado de bibliotecas de levadura basadas en el agotamiento de FcγRIIB y la selección de FcγRIIIA, de modo que se seleccionan mutantes de Fc que no solo tienen una afinidad mejorada por FcγRIIIA sino que también tienen una afinidad reducida por FcγRIIB. Las bibliotecas de levadura pueden enriquecerse para clones que tienen una afinidad reducida por FcγRIIB mediante métodos de agotamiento secuencial, por ejemplo, incubando la biblioteca de levadura con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB. El agotamiento de FcγRIIB se lleva a cabo preferiblemente de forma secuencial de modo que la biblioteca se enriquezca en clones que tienen una afinidad reducida por FcγRIIB. La etapa de agotamiento de FcγRIIB puede dar como resultado una población de células de modo que solo el 30%, preferiblemente solo el 10%, más preferiblemente solo el 5%, lo más preferiblemente menos del 1% se una a FcγRIIB. El agotamiento de FcγRIIB se puede llevar a cabo en al menos 3 ciclos, al menos 4 ciclos, al menos 6 ciclos. La etapa de agotamiento de FcγRIIB se combina preferiblemente con una etapa de selección de FcγRIIIA, por ejemplo usando un tipo de FACS de modo que se seleccionen variantes de Fc con una afinidad mejorada por FcγRIIIA.

5.2.4.1 Ensayos FACS: ensayos en fase sólida y ensayos inmunológicos

La caracterización de las proteínas de fusión Fc mutantes que se presentan en la pared celular de la superficie de la levadura, de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 5.2.3, se describe en este documento. Se describe un método para seleccionar proteínas de fusión Fc mutantes con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre que se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA. También se describe en el presente documento un método para seleccionar proteínas de fusión Fc mutantes con una propiedad de unión deseable, específicamente, la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA, y además la capacidad de la proteína de fusión Fc mutante para unirse a FcγRIIB con una afinidad menor que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIB. Un experto en la técnica apreciará que los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para identificar y cribar cualquier mutación en las regiones Fc de moléculas, con cualquier característica de unión deseada.

Las células de levadura que presentan las proteínas de fusión Fc mutantes se pueden cribar y caracterizar mediante cualquier ensayo bioquímico o inmunológico conocido por los expertos en la técnica para evaluar las interacciones de unión.

Preferiblemente, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, se usa para cribar las proteínas de fusión Fc mutantes presentadas en la superficie de la célula de levadura para la unión de FcγRIIIA, preferiblemente el complejo tetramérico de FcγRIIIA, u opcionalmente FcγRIIB. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente una gran cantidad de células individuales que contienen insertos de biblioteca (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995). Además, los parámetros específicos utilizados para la optimización, que incluyen, pero no se limitan a, la concentración de ligando (es decir, el complejo tetramérico de FcγRIIIA), el tiempo de competencia cinética o el rigor de FACS pueden variarse para seleccionar las células que muestran proteínas de fusión Fc con propiedades de unión específicas, por ejemplo, mayor afinidad por FcγRIIIA en comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 4.347.935; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage^{MR} fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS^{MR} fabricado por Union Biometrica.

Las células de levadura pueden analizarse mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). El análisis de FACS de las células de levadura se puede realizar de forma iterativa, al menos dos veces, al menos tres veces o al menos 5 veces. Entre cada ronda de selección, las células se vuelven a cultivar e inducen para que las regiones Fc se presenten en el número máximo de superficies de células de levadura. Aunque no tiene la intención de estar ligado a un modo de acción particular, este proceso iterativo ayuda a enriquecer la población de células con un fenotipo particular, por ejemplo, alta unión a FcγRIIIA.

El cribado de variantes de Fc de la invención puede comprender un proceso de selección que tiene múltiples rondas de cribado, por ejemplo, al menos dos rondas de cribado. El cribado de variantes de Fc que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIIA puede comprender las siguientes etapas: en la primera ronda de cribado, una biblioteca de

células de levadura, por ejemplo, una biblioteca sin tratamiento previo de 10^7 células se enriquece mediante FACS, preferiblemente de forma iterativa, usando por ejemplo FcyRIIIA tetramérico marcado para seleccionar variantes de Fc que tienen una afinidad mejorada por FcyRIIIA; la región Fc variante que se selecciona con el fenotipo deseado, por ejemplo, unión mejorada a FcyRIIIA, se introduce luego en un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo modificado se analiza usando un cribado secundario, por ejemplo, ELISA para unirse a un FcyR. En la segunda ronda de cribado, se puede generar una única biblioteca de mutaciones basándose en el primer cribado de modo que la región Fc alberga la variante que muestra la afinidad mejorada por FcyRIIIA; y enriquecido mediante FACS usando, por ejemplo, FcyRIIIA monomérico marcado tanto en presencia como en ausencia de receptor no marcado; y la región Fc variante se introduce luego en un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo 4-4-20, y el anticuerpo modificado se analiza usando un cribado secundario, por ejemplo, ELISA para la unión a un FcyR. El cribado secundario puede comprender además caracterizar los anticuerpos que comprenden variantes de Fc en un ensayo basado en ADCC o BIAcore usando métodos descritos en el presente documento.

Se describe el cribado de FACS de la biblioteca de levadura mutante en condiciones de equilibrio o cinéticas. Cuando el cribado se realiza en condiciones de equilibrio, se incuba un exceso de la biblioteca de levadura que porta mutantes de Fc con FcyRIIIA, preferiblemente FcyRIIIA marcado a una concentración 5-10 veces inferior a la K_d , durante al menos una hora para permitir la unión de mutantes de Fc a FcyRIIIA en condiciones de equilibrio. Cuando el cribado se realiza en condiciones cinéticas, la biblioteca de levadura mutante se incuba con FcyRIIIA marcado; a continuación, las células se incuban con FcyRIIIA equimolar sin marcar durante un tiempo preseleccionado, luego se monitoriza el FcyRIIIA unido.

Un ejemplo de método para analizar las células de levadura que expresan proteínas de fusión Fc mutantes con FACS es combinar las células con el complejo tetramérico de FcyRIIIA que ha sido marcado con un marcador fluorescente como, PE y un anticuerpo anti-Fc, tal como $F(ab)_2$ anti-Fc que ha sido marcado en forma fluorescente. Las mediciones de fluorescencia de una biblioteca de levadura producida de acuerdo con los métodos descritos en este documento implican preferiblemente comparaciones con controles; por ejemplo, células de levadura que carecen del inserto que codifica las moléculas que comprenden una región Fc (control negativo). El clasificador de flujo tiene la capacidad no solo de medir señales de fluorescencia en las células a un ritmo rápido, sino también de recolectar células que tienen propiedades fluorescentes específicas. Esta característica puede emplearse para enriquecer la población de la biblioteca inicial para células que expresan proteínas de fusión Fc con características de unión específicas, por ejemplo, mayor afinidad por FcyRIIIA en comparación con un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Las células de levadura se pueden analizar mediante FACS y se pueden establecer cuadrantes de clasificación para seleccionar las células que muestran la mayor afinidad por FcyRIIIA en relación con la cantidad de expresión de Fc en la superficie de la célula de levadura. Pueden establecerse cuatro clasificaciones consecutivas, en las que los cuadrantes para cada clasificación sucesiva son 5,5%, 1%, 0,2% y 0,1%. Se prefiere que la biblioteca de presentación en levadura formada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se muestree en al menos 10 veces para mejorar la probabilidad de aislar clones raros (por ejemplo, analizar $\sim 10^8$ células de una biblioteca de 10^7 clones). Alternativamente, se establecen 2-5 clases para seleccionar células del fenotipo deseado. Un experto en la técnica puede establecer empíricamente cuadrantes de clasificación.

Las proteínas de fusión Fc mutantes que se muestran en la superficie de la célula de levadura se pueden cribar usando ensayos basados en fase sólida, por ejemplo, ensayos que usan perlas magnéticas, por ejemplo, suministradas por Dynal, preferiblemente de una forma de alto rendimiento para unirse a un FcyR, por ejemplo, FcyRIIIA. Pueden usarse ensayos de perlas magnéticas para identificar mutantes con mayor afinidad por FcyRIIIA y/o afinidad reducida por FcyRIIB. Un ejemplo de ensayo para identificar mutantes con afinidad mejorada por FcyRIIIA y afinidad reducida por FcyRIIB puede comprender seleccionar mutantes mediante un agotamiento secuencial de fase sólida usando perlas magnéticas recubiertas con FcyRIIB seguido de selección con perlas magnéticas recubiertas con FcyRIIIA. Por ejemplo, un ensayo puede comprender las siguientes etapas: incubar la biblioteca de células de levadura generadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento con perlas magnéticas recubiertas con FcyRIIB; separar las células de levadura unidas a perlas de la fracción no unida colocando la mezcla en un campo magnético, eliminando las células de levadura no unidas y colocándolas en un medio nuevo; unir las células de levadura a perlas recubiertas con FcyRIIIA, separar las células de levadura unidas a perlas de la fracción no unida colocando la mezcla en un campo magnético, eliminar las células de levadura no unidas; eliminar las células unidas mediante un vórtice riguroso; hacer crecer las células recuperadas en medios que contienen glucosa; reinducción en medios selectivos que contienen galactosa. El proceso de selección se repite al menos una vez. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplifican luego usando metodologías comunes conocidas en la técnica, por ejemplo, PCR, y se introducen en un anticuerpo mediante métodos ya descritos para una caracterización adicional.

Puede usarse un sistema no basado en levadura para caracterizar las propiedades de unión de los anticuerpos de la invención. Un ejemplo de sistema para caracterizar los anticuerpos de la invención comprende un vector de expresión de mamífero que contiene la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína 4-4-20, en el que se clonan los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención con regiones Fc variantes. El clon recombinante resultante se expresa en una línea de células huésped de mamífero (es decir, la línea de células de riñón humano 293H), y la inmunoglobulina recombinante resultante se analiza para determinar su unión a FcyR usando cualquier ensayo estándar conocido por los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitado a ELISA y FACS.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar de diversas formas. En particular, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc modificadas pueden ensayarse para determinar la capacidad de unirse inmunespecíficamente a un ligando, por ejemplo, complejo tetramérico de FcγRIIIA. Dicho ensayo se puede realizar en solución (por ejemplo, Houghten, *Bio/Techniques*, 13: 412-421, 1992), en perlas (Lam, *Nature*, 354: 82-84, 1991), en chips (Fodor, *Nature*, 364: 555-556, 1993), en bacterias (patente de los Estados Unidos No. 5.223.409), en esporas (patentes de los Estados Unidos 89: 1865-1869, 1992) en plásmidos (Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, *Science*, 249: 386-390, 1990; Devlin, *Science*, 249: 404-406, 1990; Cwirla y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378-6382, 1990; y Felici, *J. Mol. Biol.*, 222: 301-310, 1991). Las moléculas que se han identificado que se unen inmunespecíficamente a un ligando, por ejemplo, FcγRIIIA, pueden ensayarse luego para determinar su especificidad y afinidad por el ligando.

Los anticuerpos de la invención que han sido modificados para comprender regiones Fc modificadas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) o que han sido identificados en el sistema de presentación en levadura para tener el fenotipo deseado (véase la Sección 5.1) pueden ensayarse para la unión inmunespecífica a un antígeno (por ejemplo, antígeno del cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunespecífica y la reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que utilizan técnicas tales como transferencia western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo algunos. Estos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión de los anticuerpos de la presente invención que comprenden regiones Fc modificadas a un ligando, por ejemplo, complejo tetramérico de FcγR y la constante de disociación de la interacción se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de ligando marcado, tal como FcγR tetramérico (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I) con una molécula de interés (por ejemplo, anticuerpos de la presente invención que comprenden regiones Fc modificadas) en presencia de cantidades crecientes de ligando no marcado, tal como FcγR tetramérico, y la detección de la molécula unida al ligando marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención por el ligando y las constantes de disociación de unión se pueden determinar a partir de los datos de saturación mediante análisis de Scatchard.

El análisis cinético de BIAcore se puede usar para determinar las constantes de asociación y disociación de la unión de los anticuerpos de la presente invención a un ligando tal como FcγR. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un ligando de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden regiones Fc modificadas) en su superficie.

5.2.5 Secuenciación de mutantes

Puede usarse cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560, 1977) o Sanger (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463, 1977). También se contempla que se puede utilizar cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizada (*Bio/Techniques*, 19: 448, 1995), incluida la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 94/16101, Cohen et al., *Adv. Chromatogr.*, 36: 127-162, 1996, y Griffin et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38: 147-159, 1993).

5.2.6 Ensayos funcionales de moléculas con regiones Fc variantes

La caracterización de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región Fc variante identificada por la tecnología de presentación en levadura descrita anteriormente; o anticuerpos monoclonales terapéuticos modificados de acuerdo con los métodos descritos en este documento), usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar la función de las células efectoras de las moléculas se describe en este documento. En particular, se describe la caracterización de los anticuerpos de la invención para la función de las células efectoras mediadas por FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ensayarse incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento. Se puede usar cualquier ensayo basado en células o sin células conocido por los expertos en la técnica para determinar la actividad de la función de las células efectoras (para los ensayos de células efectoras, véase Perussia et al., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini et al., 1998 *Experientia*, 44 (10): 841-8; Lehmann et al., 2000 *J. Immunol. Methods*, 243 (1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-64; Munn et al., 1990 *J. Exp. Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid et al., 2002 *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding et al., 1998, *Immunity* 8: 403-411).

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Alternativamente, la fagocitosis mediada por FcγR de los anticuerpos de la invención puede ensayarse en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana,

macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Brown EJ. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-164). La función de los anticuerpos de la invención se puede caracterizar midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja opsonizados con IgG fluoresceinada (SRBC) mediante métodos previamente descritos (Tridandapani et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 20480-7). Por ejemplo, un ejemplo de ensayo para medir la fagocitosis de los anticuerpos de la invención que comprende regiones Fc variantes con afinidades mejoradas por FcγRIIIA, comprende: tratar células THP-1 con un anticuerpo de la invención o con un anticuerpo de control que no se une a FcγRIIIA, comparando los niveles de actividad de dichas células, en las que una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubiertas de IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1), y la tasa de fagocitosis) indicaría la funcionalidad del anticuerpo de la invención. Un experto en la técnica puede apreciar que este ejemplo de ensayo puede usarse para ensayar cualquiera de las moléculas identificadas por los métodos descritos en el presente documento.

Otro ejemplo de ensayo para determinar la fagocitosis de los anticuerpos de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana tal como *Escherichia coli* marcada con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre, un anticuerpo contra la fluoresceína (véase Bedzyk et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264 (3): 1565-1569), como anticuerpo de control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que anula la unión a FcγRIII, como control de fondo para ADCP dependiente de FcγR (iii) anticuerpo 4-4-20 que porta regiones Fc variantes identificadas por los métodos descritos en este documento y producido como se ejemplifica en el Ejemplo 6.6; y formar la partícula opsonizada; añadir cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible de ATCC) en una proporción de 60:1 para permitir que ocurra la fagocitosis mediada por FcγR; preferiblemente incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1,5 horas; agregar azul de tripán después de la incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 minutos) a las células para inactivar la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; transferir células a un tampón de FACS (por ejemplo, BSA al 0,1%, en PBS, azida de sodio al 0,1%), analizar la fluorescencia de las células THP1 utilizando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 utilizadas en el ensayo se analizan mediante FACS para determinar la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto CD32A como CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea al realizar el ensayo de ADCP de acuerdo con los métodos descritos. Las células THP-1 se bloquean preferiblemente con 100 µg/ml de IgG1 soluble o suero humano al 10%. Para analizar la extensión de ADCP, el cuadrante se establece preferiblemente en células THP-1 y se mide la intensidad de fluorescencia media. La actividad de ADCP para mutantes individuales se calcula y se informa como un valor normalizado para el chMab 4-4-20 de tipo silvestre obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a las células THP-1 de manera que la relación de las partículas opsonizadas a las células THP-1 sea 30:1 o 60:1. El ensayo de ADCP se puede realizar con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que sirvan como actividad de ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre (para servir como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (para servir como control de fondo para la actividad de ADCP dependiente de FcγR).

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para determinar la actividad de ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, células asesinas naturales, utilizando cualquiera de los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Perussia et al., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92). Un ejemplo de ensayo para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos de la invención se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar las células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula permeable a la membrana celular se usa comúnmente para el etiquetado ya que se une a proteínas citoplasmáticas y, aunque se libera espontáneamente de las células con una cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de la célula diana); opsonizar las células diana con los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes; combinar las células diana opsonizadas radiomarcadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción apropiada de células diana con respecto a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; recolectar los sobrenadantes; y analizar la radiactividad. A continuación, se puede determinar la citotoxicidad de los anticuerpos de la invención, por ejemplo usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental - cpm de fuga diana)/(cpm de lisis de detergente - cpm de fuga diana) x 100%. Alternativamente, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con los anticuerpos de la invención - % de lisis en ausencia de los anticuerpos de la invención. Se puede generar un gráfico variando la proporción de células diana: efectoras o la concentración de anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) véase, por ejemplo, Ding et al., *Immunity*, 1998, 8: 403-11.

Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC descritos en este documento son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente a partir de sangre humana normal, usando métodos estándar conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos descritos en el presente

documento expresan diferentes receptores activadores de FcγR. Se describen células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresa tanto FcγRIIIA como FcγRIIB, para determinar si los mutantes del anticuerpo Fc muestran una mayor actividad de ADCC y fagocitosis en relación con los anticuerpos IgG1 de tipo silvestre.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit et al., 1991, J. Leuk. Biol. 49: 556). Las células THP-1 no expresan constitutivamente FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcR (Pricop et al., 2000 J. Immunol. 166: 531-7). El crecimiento de células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y provoca una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también se puede potenciar mediante el aumento de la densidad celular (Tridandapani et al., 2002, J. Biol Chem. 277: 5082-9). Por el contrario, se ha informado de que el IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIIA (Pearse et al., 1993 PNAS USA 90: 4314-8). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular puede determinarse mediante FACS usando métodos comunes conocidos por un experto en la técnica. La expresión de FcγR inducida por citocinas en la superficie celular proporciona un sistema para probar tanto la activación como la inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no pueden expresar el FcγRIIB, se puede usar otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian terminalmente en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren et al., 1979, Nature 279: 328-331).

La muerte de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por macrófagos y células NK en modelos de tumores de ratón (Clynes et al., 1998, PNAS USA 95: 652-656). Se describe el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de mutantes de Fc para desencadenar la citotoxicidad celular de las células diana en ensayos de fagocitosis y ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIIA y FcγRIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR de monocitos elutriados congelados, monocitos elutriados frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10% y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano puede determinarse usando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden teñirse con anticuerpos específicos de FcγR y analizarse mediante FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que imitan mejor la expresión de FcγR de macrófagos *in vivo* se utilizan entonces para los métodos descritos en el presente documento.

Pueden usarse células de ratón, especialmente cuando no se pueden obtener células humanas con los perfiles de FcγR correctos. La línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (ATCC), que puede transfectarse con FcγRIIIA humano y transfectantes estables aislados usando métodos conocidos en la técnica, (véase, por ejemplo, Ralph et al., J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para la expresión de FcγRIIIA mediante análisis de FACS usando experimentación de rutina y pueden usarse altos expresadores en los ensayos de ADCC descritos en este documento. También se describe en el presente documento el aislamiento de macrófagos peritoneales del bazo que expresan FcγR humano a partir de ratones transgénicos inactivados como los descritos en el presente documento. Los linfocitos se pueden recolectar de sangre periférica de donantes (PBM) usando un de gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población de células mononucleares aisladas, la mayor parte de la actividad de ADCC se produce a través de las células asesinas naturales (NK) que contienen FcγRIIIA pero no FcγRIIB en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en la activación de la ADCC de células NK y establecen los reactivos para ensayar con monocitos elutriados.

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

El ensayo de ADCC se basa en la capacidad de las células NK para mediar en la muerte celular a través de una vía apoptótica. Las células NK median la muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIIA de IgG unida a un antígeno en la superficie celular. Los ensayos de ADCC usados de acuerdo con los métodos descritos en este documento pueden ser ensayos basados en radiactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo de ADCC utilizado para caracterizar los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar células diana, por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, opsonizar células diana con un anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular en la célula diana a través de su sitio de unión al antígeno; combinar las células diana opsonizadas marcadas y las células efectoras en una proporción apropiada, que puede determinarse mediante experimentación rutinaria; recolectar las células; detectar el marcador en el sobrenadante de las células diana lisadas, utilizando un esquema de detección apropiado basado en el marcador utilizado. Las células diana pueden marcarse con un marcador radiactivo o un marcador fluorescente, usando métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, $^{51}\text{Cr}[\text{Na}_2\text{CrO}_4]$; y el éster acetoximetílico del ligando mejorador de la fluorescencia, 2,2': 6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA).

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

El ensayo de ADCC utilizado para caracterizar los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes puede comprender las siguientes etapas: preferiblemente, 4-5x10⁶ células diana (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) están marcadas con bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficacia de marcación óptima, el número de células diana utilizadas en el ensayo de ADCC no debería exceder preferiblemente de 5x10⁶. Se agrega reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37 °C, preferiblemente bajo 5% de CO₂, durante al menos 30 minutos. A continuación, las células se lavan con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfinpirazol 0,125 mM y medio que contiene sulfinpirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas se opsonizan (recubren) con un anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante, que incluye, pero no se limitan a, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. La inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo de ADCC puede ser específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno del cáncer. El anticuerpo en el que se introduce una región Fc variante de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno tumoral o canceroso, como los enumerados en la sección 5.4. Además, el anticuerpo en el que se introduce una región Fc variante de la invención puede ser cualquier anticuerpo terapéutico específico para un antígeno del cáncer, tal como los enumerados en la sección 5.4. La inmunoglobulina que comprende una región Fc variante usada en el ensayo de ADCC puede ser un anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 *J. Biol. Chem.* 257 (12): 6987-6995) anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano de ratón 2H7 (Liu et al., 1987, *Journal of Immunology*, 139: 3521-6); o un anticuerpo humanizado (Ab4D5) contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (p185 HER2) (Carter et al., (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-9). Las células diana en el ensayo de ADCC se eligen de acuerdo con el anticuerpo en el que se ha introducido una región Fc variante de la invención de modo que la inmunoglobulina se una a un receptor de superficie celular de la célula diana de manera específica. Preferiblemente los ensayos de ADCC descritos en el presente documento se llevan a cabo usando más de un anticuerpo modificado, por ejemplo anti Her2/neu, 4-4-20, 2B6, Rituxan y 2H7, que albergan las variantes de Fc de la invención. Las variantes de Fc de la invención pueden introducirse en al menos 3 anticuerpos y pueden ensayarse sus actividades de ADCC. Aunque no se pretenda estar ligado por un mecanismo de acción particular, el examen de al menos 3 anticuerpos en estos ensayos funcionales disminuirá la posibilidad de eliminar erróneamente una mutación Fc viable.

Las células diana opsonizadas se añaden a las células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir relaciones efector: diana de aproximadamente 50:1, 75:1 o 100:1. Cuando la inmunoglobulina que comprende una región Fc variante tiene el dominio variable de 4-4-20, la relación efector:diana puede ser 75:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, bajo 5% de CO₂. Los sobrenadantes celulares se recogen y se añaden a una solución de europio ácida (por ejemplo, solución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan mediante la incubación de las células diana con TX-100 al 1% y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide mediante la incubación de células diana y efectoras en ausencia de anticuerpo. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como: liberación experimental (ADCC - AICC)/(MR-SR) x 100.

5.2.7 Otros ensayos

Los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes también pueden ensayarse usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la unión de interacción Fc-FcγR. Cualquier instrumento SPR disponible comercialmente, incluidos, pero no se limitan a, Biacore Instruments, disponible de Biacore AB (Uppsala, Suecia); Instrumentos IAsys disponibles a través de Affinity Sensors (Franklin, MA); sistema IBIS disponible a través de Windsor Scientific Limited (Berks, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA disponibles a través de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón) y SPR Detector Spreeta disponible a través de Texas Instruments (Dallas, TX) se pueden utilizar en la presente invención. Para una revisión de la tecnología basada en SPR, véase Mullet et al., 2000, *Methods* 22: 77-91; Dong et al., 2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303-23; Fivash et al., 1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101; Rich et al., 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61. Además, cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados en SPR para medir interacciones proteína-proteína descritos en las patentes de los Estados Unidos No. 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125 se contemplan en los métodos descritos en el presente documento.

Brevemente, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro de un par de unión en una superficie y controlar su interacción con el otro miembro del par de unión en solución en tiempo real. La SPR se basa en medir el cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es el núcleo de la tecnología SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base de una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores están disponibles comercialmente, especialmente de las compañías enumeradas anteriormente, todos los cuales pueden usarse en los métodos descritos en este documento. Los ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Sensor Chip CM5, SA, NTA y HPA. Un anticuerpo de la invención se puede inmovilizar sobre la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos y químicas de inmovilización conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, unión de biotina a la superficie recubierta de avidina, acoplamiento de aldehído a grupos de carbohidratos y unión a través de la etiqueta de histidina con chips NTA.

Los parámetros cinéticos de la unión de anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes, por ejemplo, inmunoglobulinas que comprenden región Fc variante, a un FcγR pueden determinarse usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Puede usarse cualquier FcγR para evaluar la interacción con los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes. El FcγR puede ser FcγRIIIA, preferiblemente un FcγRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, el FcγRIIIA monomérico soluble puede ser la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia enlazador-AVITAG (véase, solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/439.498, presentada el 9 de enero de 2003 (Expediente del abogado No. 11 183-004-888) y solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/456.041 presentada el 19 de marzo de 2003). El FcγR puede ser FcγRIIB, preferiblemente un FcγRIIB dimérico soluble. Por ejemplo, la proteína FcγRIIB dimérica soluble se puede preparar de acuerdo con la metodología descrita en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/439.709 presentada el 13 de enero de 2003.

Un ejemplo de ensayo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende una región Fc variante, en la que la molécula es el anticuerpo 4-4-20, para un FcγR usando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: BSA-FITC se inmoviliza en una de las cuatro celdas de flujo de la superficie de un chip sensor, preferiblemente a través de la química de acoplamiento de amina de manera que se inmovilicen aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) de BSA-FITC en la superficie. Una vez que se prepara una superficie adecuada, los anticuerpos 4-4-20 que portan las mutaciones Fc se pasan sobre la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. El nivel de anticuerpos 4-4-20 unidos a la superficie varía entre 400 y 700 RU. A continuación, se inyecta una serie de diluciones del receptor (proteína FcγRIIA y de fusión FcγRIIB-Fc) en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5) en la superficie a razón de 100 µl/min. La regeneración de anticuerpos entre diferentes diluciones del receptor se lleva a cabo preferiblemente mediante inyecciones únicas de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM pH 9,4; NaCl 3M. En el método descrito en el presente documento se contempla cualquier técnica de regeneración conocida en el arte.

Una vez que se recopila un conjunto de datos completo, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente utilizando algoritmos informáticos suministrados por el fabricante del instrumento SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la $K_{\text{asociación}}$ como $K_{\text{disociación}}$, a partir de las cuales la constante de unión de equilibrio aparente, K_d , se deduce como la relación de las dos constantes de velocidad (es decir, $K_{\text{asociación}} / K_{\text{disociación}}$). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el Manual de software de BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher et al., 1994, Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5: 65-71; Chaiken et al., 1992, Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton et al., 1995, Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83.

Los parámetros cinéticos determinados usando un análisis SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden usarse como una medida predictiva de cómo funcionará un anticuerpo de la invención en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un ejemplo de método para predecir la eficacia de un anticuerpo de la invención basado en parámetros cinéticos obtenidos de un análisis SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de $K_{\text{disociación}}$ para la unión de un anticuerpo de la invención a FcγRIIIA y FcγRIIB; graficando (1) $K_{\text{disociación}}(\text{wt}) / K_{\text{disociación}}(\text{mut})$ para FcγRIIIA; (2) $K_{\text{disociación}}(\text{mut}) / K_{\text{disociación}}(\text{wt})$ para FcγRIIB contra los datos de ADCC. Los números superiores a uno muestran una menor tasa de disociación para FcγRIIIA y una mayor tasa de disociación para FcγRIIB en relación con la de tipo silvestre; y poseen una función ADCC mejorada.

5.3 Métodos de producción recombinante de anticuerpos de la invención

5.3.1 Polinucleótidos que codifican anticuerpos de la invención

También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención identificados mediante los métodos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención pueden obtenerse y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

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

15 Cuando los ácidos nucleicos codifican anticuerpos, una o más de las CDR pueden insertarse dentro de las regiones marco usando técnicas de ADN recombinante de rutina. Las regiones marco pueden ser regiones marco de origen natural o de consenso, y preferiblemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 para una lista de regiones marco humanas).

20 Las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica se pueden cribar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica para clonar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención.

5.3.2 Expresión recombinante de anticuerpos de la invención

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

35 Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo identificado por los métodos descritos en el presente documento puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, Electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas se cultivan luego mediante técnicas convencionales para producir los anticuerpos de la invención. La expresión de los anticuerpos de la invención puede ser regulada por un promotor específico constitutivo, inducible o tisular.

40 Las células huésped utilizadas para expresar las moléculas identificadas por los métodos descritos en este documento pueden ser células bacterianas como *Escherichia coli* o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamíferos como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector como el principal elemento promotor del gen temprano intermedio del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foelcking et al., 1998, *Gene* 45: 101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8: 2).

45 Puede utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión de huésped para expresar las moléculas identificadas por los métodos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de los anticuerpos de la invención pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar los anticuerpos de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes para las moléculas identificadas por los métodos descritos en este documento; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos descritos en este documento; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos descritos en el presente documento; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos descritos en este documento; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase el documento US 5.807.715), células Per C.6 (células retinianas humanas desarrolladas por Crucell) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus vaccinia de 7,5K).

- En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante de *lac Z* de modo que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina de modo que el producto del gen diana clonado pueda liberarse de la fracción GST.
- En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).
- En células huésped de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse luego en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl Acad. Sci. USA 81: 355 - 359). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias insertadas codificantes de anticuerpos. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos mejoradores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544).
- Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.
- Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresen de manera estable un anticuerpo de la invención. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, mejorador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células modificadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresen los anticuerpos de la invención. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con los anticuerpos de la invención.
- Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202), y pueden emplearse los genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, 3: 87-95; Tolstoshev,

1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; mayo de 1993, *TIB TECH* 11 (5): 155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene* 30: 147).

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

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

Una vez que un anticuerpo de la invención se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos o anticuerpos, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía en columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de polipéptidos o anticuerpos.

5.4 Métodos profilácticos y terapéuticos

La presente invención abarca el anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto. Esto puede implicar la administración de uno o más de los anticuerpos de la invención a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en el que se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR. Las composiciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades neoplásicas primarias o metastásicas (es decir, cáncer) y enfermedades infecciosas. Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento. Como se detalla a continuación, los anticuerpos de la invención se pueden usar en métodos para tratar o prevenir el cáncer (particularmente en inmunoterapia pasiva), enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de un cáncer, enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios o enfermedades infecciosas. Los anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o actividad de las células efectoras que interactúan con las moléculas y aumentan la respuesta inmune. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, por ejemplo, como se detalla en las secciones 5.4.1.2 y 5.4.2.1 a continuación.

5.4.1 Cánceres

La invención abarca una composición para su uso en el tratamiento de cáncer o metástasis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden una región Fc variante.

Los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes pueden usarse para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o metástasis de células cancerosas. En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una variante de Fc que se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre que se une a FcγRIIIA, en la que opcionalmente dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas pueden

usarse solas para tratar o prevenir el cáncer. En otra realización, el anticuerpo de la invención comprende una región Fc variante que se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA, y además se une a FcγRIIB con una afinidad menor que un polipéptido comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIB, en la que opcionalmente dicha región Fc variante tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Tales moléculas también pueden usarse solas para tratar o prevenir el cáncer.

En algunas realizaciones, la invención abarca composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR tales como los homocigotos para los alelos FcγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. En algunas realizaciones, la invención abarca anticuerpos terapéuticos modificados, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor de acuerdo con los métodos descritos en este documento, de modo que los anticuerpos modificados tengan una eficacia mejorada en pacientes homocigotos para el alelo de baja afinidad de FcγRIIIA (158F). En otras realizaciones, la invención abarca anticuerpos terapéuticos modificados, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, de modo que los anticuerpos modificados tengan una eficacia mejorada en pacientes homocigotos para el alelo de alta afinidad de FcγRIIIA (158V).

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

Un ejemplo de método para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-CD20 modificados genéticamente en un sujeto puede incluir lo siguiente: Pueden usarse plásmidos que albergan genes quiméricos de cadena pesada anti-HER2/neu con mutaciones Fc que muestran una destrucción sustancialmente mayor en ADCC como cadena principal para transferir en el dominio variable del gen de la cadena pesada de Rituximab. La región variable de la variante Fc anti-HER2/neu se reemplaza con la región variable de Rituximab. Los plásmidos que contienen dominios Fc de tipo silvestre o una mutación D265A para anular la unión de FcR, o las variantes de Fc anti-CD20 se cotransfectan transitoriamente con el gen de la cadena ligera de Rituximab en células 293H, medios acondicionados y el anticuerpo se purifica sobre una columna de proteína G utilizando métodos de rutina.

Los mAb anti-CD20 que albergan las variantes de Fc se prueban mediante ADCC usando una línea de células B cultivadas para determinar la capacidad de las mutaciones de Fc para potenciar la ADCC. La ADCC estándar se realiza usando métodos descritos en este documento. Los linfocitos se recolectan de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células diana Daudi, una línea de células B que expresa CD20, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con efectores durante 4 horas a 37 °C. El europio liberado se detecta utilizando un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las variantes de Fc para desencadenar la citotoxicidad mediada por células NK y establecen qué variantes de Fc anti-CD20 pueden probarse tanto con muestras de pacientes como con monocitos elutriados. Las variantes de Fc que muestran el mayor potencial para mejorar la eficacia del anticuerpo anti-CD20 se prueban luego en un ensayo de ADCC utilizando PBMC de pacientes. Las PBMC de donantes sanos se utilizan como células efectoras. Los ensayos de ADCC *in vitro* que utilizan variantes anti-CD20 y rituximab se realizan en células de linfoma primario de pacientes con linfoma folicular. El polimorfismo de FcγR específico de los donantes se determina y cataloga usando métodos conocidos en la técnica. El ensayo de ADCC se realiza mediante células efectoras de pacientes con diferentes genotipos de FcγRIIIA y FcγRIIA.

De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes mejoran la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer al aumentar la potencia de la función efectora del anticuerpo en relación con una molécula que contiene la región Fc de tipo silvestre, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. En una realización específica, la toxicidad celular dependiente de anticuerpos y/o la fagocitosis de las células tumorales se potencia utilizando los anticuerpos de la invención con regiones Fc variantes. Los anticuerpos de la invención pueden mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer con inmunoterapia mejorando al menos una función efectora mediada por anticuerpos. En una realización particular, un anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento de inmunoterapia mejorando la cascada dependiente del complemento. En otra realización de la invención, el anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento de inmunoterapia mejorando la fagocitosis y/o la opsonización de las células tumorales diana. En otra realización de la invención, el anticuerpo de la invención que comprende una región Fc variante mejora la eficacia del tratamiento aumentando la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales diana.

La invención contempla además anticuerpos terapéuticos modificados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor) para mejorar la eficacia terapéutica del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, mejorando la función efectora del anticuerpo terapéutico (por ejemplo, ADCC). Preferiblemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo citotóxico y/u opsonizante. Un experto en la técnica apreciará que una vez que los anticuerpos de la invención con propiedades de unión deseadas (por ejemplo, moléculas con regiones Fc variantes con al menos una modificación de aminoácido, dicha modificación mejora la afinidad de la región Fc variante por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable, que comprende una región Fc de tipo silvestre) (véase la Sección 5.2 y la Tabla 5) de acuerdo con los métodos descritos en este documento, los anticuerpos terapéuticos pueden modificarse mediante técnicas de ADN recombinante estándar y cualquier técnica de mutagénesis conocida, como se describe en la Sección 5.2.2 para producir un tratamiento terapéutico modificado que porta los sitios de mutación identificados con las propiedades de unión deseadas. Cualquiera de los anticuerpos terapéuticos enumerados en la Tabla 6 que han demostrado utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer, puede modificarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento, por ejemplo, modificando la región Fc para que tenga una afinidad mejorada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en comparación con un anticuerpo terapéutico que tiene una región Fc de tipo silvestre y se usa para el tratamiento y/o prevención de un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer.

La invención también abarca otros anticuerpos modificados que comprenden una región Fc que tiene utilidad terapéutica, que incluye, pero no se limitan a, ENBREL, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, con el fin de mejorar la eficacia terapéutica de dichos polipéptidos, por ejemplo, mejorando la función efectora del polipéptido que comprende una región Fc.

Tabla 6. Anticuerpos terapéuticos que pueden ser modificados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento

Compañía	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	Receptor del EGF
AltaRex	OvaRex	Cáncer de ovario	Antígeno tumoral CA125
	BravaRex	Cánceres metastásicos	Antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pentumomabytrrium-90)	Cáncer de ovario	Antígeno PEM
	Therex	Cáncer de mama	Antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	Cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Accidente cerebrovascular	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	isquémico NHL	CD20
CRC Technology	Mab, 105AD7 idiopático	Vacuna de cáncer colorrectal	Gp72
Crucell	Anti-EpCAM	Cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	Mab, cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptina	Cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptina	Cáncer de mama en etapa temprana	HER-2
	Rituxan	NHL de grado bajo o folicular de recaída/refractaria Intermediario &	CD20
	Rituxan		CD20
	Mab-VEGF	LNH de alto grado NSCLC metastásico, cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	Mab-VEGF		VEGF
	AMD Fab	Degeneración macular relacionada con la edad,	CD18
	E-26 (2 ^{da} gen. IgE)	Asma y rinitis alérgica	IgE

IDEC	Zevalin (Rituxan + Itrio 90)	bajo grado de NHL de células B positivas para CD20 folicular, de recaída o refractario, y NHL refractario a Rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + irinotecano	Carcinoma colorrectal refractario	Receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino & radiación	Cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente	Receptor del EGF
	Cetuximab + gemcitabina	Carcinoma de páncreas metastásico recién diagnosticado	Receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	Cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	Receptor del EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas recién diagnosticado	Receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino	Cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional incurable extensa y metástasis distantes)	Receptor del EGF
	Cetuximab + radiación	Carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado	Simula GD3 de gangliósido
	BEC2 + Guerina de Bacillus Calmette	Carcinoma de pulmón de células pequeñas	Simula GD3 de gangliósido
	BEC2 + Guerina de Bacillus Calmette	Melanoma	Receptor del VEGF
		Cáncer colorrectal con metástasis en hígado	
ImmonoGen	nuC242-DM1	Cáncer colorrectal, gástrico y de páncreas	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no Hodgkins	CD22
	LymphoCide	Linfoma no Hodgkins	CD22
	CFA-Cide	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CFA-Cide y-90	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer colorrectal (radioimagenología)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimagenología)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de pulmón (radioimagenología)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	Tumores intraoperatorios (radioimagenología)	CD22
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	Infección de tejidos blandos (radioimagenología)	AFP
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	Linfomas (radioimagenología)	
		Cánceres de células germinales de hígado 7 (radioimagenología)	
Intracel	HumaRAD-HN (+ Itrio 90)	Cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	Imagenología colorrectal	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	Cánceres de próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (sobreexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
MedImmune Merck KGaA	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
	Vitaxin	Cáncer	$\alpha v \beta_3$
	Mab 425	Cánceres varios	Receptor del EGF
	IS-IL-2	Cánceres varios	Ep-CAM
Millennium NeoRx	Campath (alemtuzumab)	Leucemia linfocítica crónica	CD52
	CD20-estreptavidina (+ biotina-Itrio 90)	Linfoma no Hodgkin	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	Cáncer metastásico	NA

Peregrine	Oncolym (+ yodo 131)	Linfoma no Hodgkin	HLA-DR 10 beta Proteínas asociadas a ADN
	Cotara (+ yodo 131)	Glioma maligno irreseccable	NA
Pharmacia Corporation	C125 (+ enterotoxina estafilocócica)	Cáncer de páncreas	NA
	Mab, cáncer pulmón/riñón Nacolomab tafentox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	Cáncer de pulmón & riñón Cáncer de colon y páncreas	NA NA
Protein Design Labs	Nuvion	Neoplasias malignas de células T	CD3
	SMART M195 SMART 1D10	AML NHL	CD33 Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac TriGem	Cáncer colorrectal, melanoma metastásico avanzado & cáncer de pulmón de células pequeñas	CEA GD2- gangliósido
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac TriGem	Cáncer colorrectal, avanzado Melanoma metastásico & cáncer de pulmón de células pequeñas	CEA GD2- gangliósido
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia	NovoMAb-G2 radiomarcado	Linfoma no Hodgkin	NA
Biotech	Monopharm C GliomaMab-H (+ toxina gelonina)	Carcinoma colorrectal y pancreático Glioma, melanoma & neuroblastoma	Antígeno SK-1 NA
Xoma	Rituxan	LNH folicular o de bajo grado recidivante/ refractario	CD20
	Rituxan ING-1	NHL de grado intermedio & alto Adenocarcinoma	CD20 Ep-CAM

- En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo terapéutico para su uso en el tratamiento, en un sujeto, de un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, en el que el anticuerpo terapéutico se une a un antígeno del cáncer y es citotóxico y se ha modificado en uno o más sitios en la región Fc, de acuerdo con la invención, para unir FcγRIIIA con una afinidad más alta que el anticuerpo terapéutico original y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) más eficazmente. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo terapéutico para su uso en el tratamiento, en un sujeto, de un cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, en el que el anticuerpo terapéutico se une a un antígeno del cáncer y es citotóxico, y se ha modificado de acuerdo con la invención para unirse a FcγRIIIA con una afinidad más alta y unirse a FcγRIIB con una afinidad menor que el anticuerpo terapéutico original y/o media la función efectora (por ejemplo, ADCC, fagocitosis) de manera más eficaz. Los anticuerpos terapéuticos que se han modificado de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, ya que tienen una actividad citotóxica mejorada (por ejemplo, una mayor destrucción de células tumorales y/o por ejemplo, una mayor actividad de ADCC o actividad de CDC).
- Los cánceres asociados con un antígeno del cáncer se pueden tratar o prevenir mediante la administración de un anticuerpo terapéutico que se une a un antígeno del cáncer y es citotóxico, y se ha modificado de acuerdo con los métodos descritos en este documento para tener, por ejemplo, una función efectora mejorada. En una realización particular, los anticuerpos terapéuticos modificados de acuerdo con los métodos descritos en este documento mejoran el efecto citotóxico mediado por anticuerpos del anticuerpo dirigido al antígeno del cáncer particular. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los siguientes antígenos de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante los anticuerpos y composiciones de la invención: antígeno de pancarcinoma KS 1/4 (Pérez y Walker, 1990, J. Immunol. 142: 32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4): 407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51 (2): 48-475), fosfato de ácido prostático (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18 (1): 4928), antígeno prostático específico (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10 (2): 903-910; Israelí et al., 1993, Cancer Res. 53: 227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81 (6): 445-44), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171 (4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, Cancer 59: 55-3; Mittelman et al., 1990, J. Clin. Invest. 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno 38.13 del linfoma de Burkitt, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno CD20 de linfoma B humano (Reff et al., 1994, Blood 83: 435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36: 373-

380), gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53: 5244-5250), tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos por virus que incluyen virus tumorales de ADN del antígeno T y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno-alfa-fetoproteína oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal tumoral de vejiga (Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de células T de leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17: 359), antígeno APO-1 de linfocito humano maligno (Bernhard et al., 1989, Science 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales y el endodermo primario, I(Ma) que se encuentra en adenocarcinomas, M18 y M39 encontrados en el epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D₁₅₆₋₂₂ encontrados en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^γ encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), EGF receptor encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^γ) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19,9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, GD2, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en estadio de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T (véase Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse con anticuerpos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias que incluyen, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero sin limitarse a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; sarcomas de tejido óseo y conectivo tales como, pero no se limitan a, sarcoma de hueso, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales que incluyen, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, glioma de tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, que incluye, pero no se limita a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero sin limitarse a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, que incluye, pero no se limita a, insulinooma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres de pituitaria que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares que incluyen, pero no se limitan a, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma de coroides y melanoma de cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales, que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva, que incluye, pero no se limita a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de endometrio y sarcoma de útero; cánceres de ovario que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma epitelial de ovario, tumor límite, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres de esófago que incluyen, pero no se limitan a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de avena (células pequeñas); cánceres de estómago que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulcerante, diseminación superficial, diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres de recto; cánceres de hígado que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen, pero no se limitan a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares que incluyen, pero no se limitan a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatoocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor

del saco vitelino), cánceres de próstata que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, y rhabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe que incluyen, pero no se limitan a, 5 cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma y melanoma de células escamosas, melanoma que se extiende superficialmente, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o útero); tumor de Wilms; cánceres de vejiga que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células de transición, 10 cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos véase Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., JB Lippincott Co., Filadelfia y Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The 15 Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books USA, Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, los anticuerpos y las composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, que incluyen (pero no se limitan a) las 20 siguientes: carcinoma, incluido el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cuello uterino, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma y rhabdomiosarcoma; otros tumores, incluidos melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; 25 tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres provocados por aberraciones en la apoptosis también serían 30 tratados por los anticuerpos y composiciones de la invención. Dichos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios malignos o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, pueden ser tratados o prevenidos por los anticuerpos y composiciones de la invención en el ovario, 35 vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, el melanoma o la leucemia pueden tratarse o prevenirse mediante los anticuerpos y las composiciones de la invención.

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

5.4.1.1 Terapia de combinación

El anticuerpo terapéutico para su uso en el tratamiento, en un sujeto, de un cáncer caracterizado por un antígeno del 50 cáncer de acuerdo con la invención puede comprender además otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o la prevención del cáncer, que incluyen pero no se limita a, quimioterapias estándar y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, terapias de radiación o cirugía. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes anticancerosos, anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos enumerados en la Tabla 3) u otros agentes conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento 55 y/o prevención del cáncer (véase la Sección 5.4.1.2).

En determinadas realizaciones, uno o más anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, al mismo tiempo que uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. El término "al mismo tiempo" no se limita a la administración de agentes profilácticos o 60 terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que significa que un anticuerpo de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera que el anticuerpo de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes 65 momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar

por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En varias realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con una diferencia de menos de 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, con una diferencia de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una diferencia de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una diferencia de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una diferencia de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas con una diferencia de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una diferencia de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas con una diferencia de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas con una diferencia de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas con una diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas con una diferencia de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas con una diferencia, de no más de 24 horas o con una diferencia de no más de 48 horas. En realizaciones preferidas, se administran dos o más componentes dentro de la misma visita del paciente.

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

En determinadas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos para usar con la invención se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguida de la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

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

En otras realizaciones más, los agentes terapéuticos y profilácticos para usar con la invención se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea mediante infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar la dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Normalmente, los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se utilizan en dosis más bajas. Dichos regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante períodos de tiempo prolongados. En realizaciones preferidas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los períodos de descanso. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran mediante infusión crónica de dosis baja o continua que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. El oncólogo experto puede optimizar la programación de tales regímenes de dosis.

En otras realizaciones, los cursos de tratamiento se administran simultáneamente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los compuestos terapéuticos por separado pero dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la invención puedan trabajar junto con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez por semana en combinación con los otros componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación para los compuestos terapéuticos se llevan a cabo simultáneamente incluso si los compuestos terapéuticos no se administran simultáneamente o dentro de la misma visita del paciente.

Cuando se usa en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, los anticuerpos de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferiblemente, sinérgicamente. En una realización, un anticuerpo de la invención se administra al mismo tiempo que uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. En otra realización, un anticuerpo de la invención se administra al mismo tiempo que uno o más de otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas separadas. En otra realización más, se administra un anticuerpo de la invención antes o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. La invención contempla la administración de un anticuerpo de la invención en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos mediante la misma o diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. En determinadas realizaciones, cuando un anticuerpo de la invención se administra simultáneamente con otro agente profiláctico o terapéutico que potencialmente produce efectos secundarios adversos que incluyen, pero no se limitan

a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico se puede administrar ventajosamente en una dosis que cae por debajo del umbral en el que se produce el efecto secundario adverso.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en este documento están englobadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosis y la frecuencia variarán típicamente según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia médica pasada del paciente. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes adecuados considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosis informadas en la bibliografía y recomendadas en la Physician's Desk Reference (edición 56, 2002).

5.4.1.2 Otros agentes terapéuticos/profilácticos

En una realización específica, el anticuerpo terapéutico para usar en el tratamiento de acuerdo con la invención comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o prevención del cáncer. En una realización, los inhibidores de la angiogénesis se pueden administrar en combinación con los anticuerpos de la invención. Los inhibidores de la angiogénesis que se pueden usar con los anticuerpos y las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado del cartílago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); Fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; Fragmento de hexasacáridos de heparina; HMV833; Gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; Proteína inducible por interferón (IP-10); Interleucina 12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; Inhibidores de metaloproteinasas (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; Inhibidor de la ribonucleasa placentaria; Inhibidor del activador de plasminógeno; Factor plaquetario 4 (PF4); Prinomastat; Fragmento de prolactina de 16 kD; Proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerosos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la invención en las diversas realizaciones de la invención, incluidas las composiciones farmacéuticas de la invención, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodopa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluida la interleucina II recombinante 2 o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1 a; interferón gamma-1 b; iroplatino; clorhidrato de irinotecano; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiomicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina. Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-

dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrona; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; 5 benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de betalactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartilago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida 10 de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamilo; diaziquona; didemnina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azaciditidina; dihidrotaxol-9; dioxamicina; 15 difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxilifuridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasteride; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; 20 hexametilén bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrin B; itasetrona; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamellarina-N; lanreotido; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón 25 alfa de leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarone; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario desemparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafide; factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular sk de miobacterias; mopidamol; inhibidor de genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor de tumores múltiples 1; agente anticanceroso 35 mostaza; micaperoxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamida N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavin; nafterpina; nastrograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nítróido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotido; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrona; ondansetrona; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; 40 análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; 45 propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxitileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrona; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; 50 retinamida RII; rogletimida; rohitucina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señal; moduladores de transducción de señal; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermin; ácido esparfosico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; 55 escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámidia; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metioduro de tamoxifeno; taumomustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; 60 inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporetído; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina stimalmer. Los fármacos anticancerosos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina. 65

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que se pueden usar con los anticuerpos de la invención incluyen pero no se limitan a ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX^{MR}, que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular anti-17-IA murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG anti-idiotipo murino (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN^{MR}, que es un anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta3$ humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195, que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE^{MR}, que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un IgG anti-CD3 humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF- α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- $\alpha4\beta7$ humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA^{MR} es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN^{MR} es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β_2 humano (Cambridge Ab Tech). En la Tabla 6 se presentan otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con la invención.

5.4.2 Enfermedad autoinmune y enfermedades inflamatorias

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, modificación que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA. Los anticuerpos de la invención con tales características de unión son útiles para regular la respuesta inmune, por ejemplo, para inhibir la respuesta inmune en relación con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no pretenden unirse a ningún mecanismo de acción, los anticuerpos de la invención con una afinidad mejorada por Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA pueden conducir a la amortiguación de la respuesta de activación a Fc γ R e inhibición de la respuesta celular.

Se describe una molécula que comprende una región Fc variante que no es una inmunoglobulina, y comprende al menos una modificación de aminoácido cuya modificación aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB en relación con una molécula que comprende una región Fc de tipo silvestre. Dicha molécula puede comprender además una o más modificaciones de aminoácidos, modificaciones que disminuyen la afinidad de la molécula por un Fc γ R activador. La molécula puede ser una región Fc soluble (es decir, no unida a la membrana). Se contemplan otras modificaciones de aminoácidos dentro de la región Fc soluble que modulan su afinidad por varios receptores Fc, incluidas las conocidas por un experto en la técnica como se describe en el presente documento. La molécula (por ejemplo, la región Fc que comprende al menos una o más modificaciones de aminoácidos) puede modificarse usando técnicas conocidas por un experto en la técnica y como se describe en el presente documento para aumentar la vida media *in vivo* de la región Fc. Dichas moléculas tienen utilidad terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune. Aunque no pretenden estar unidas por ningún mecanismo de acción, tales moléculas con mayor afinidad por Fc γ RIIB conducirán a una amortiguación de los receptores activadores y, por lo tanto, a una amortiguación de la respuesta inmune y tendrán eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune.

Las una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA, pueden comprender una sustitución en la posición 246 con treonina y en la posición 396 con histidina; o una sustitución en la posición 268 con ácido aspártico y en la posición 318 con ácido aspártico; o una sustitución en la posición 217 con serina, en la posición 378 con valina y en la posición 408 con arginina; o una sustitución en la posición 375 con cisteína y en la posición 396 con leucina; o una sustitución en la posición 246 con isoleucina y en la posición 334 con asparagina. Las una o más modificaciones de aminoácidos, que aumentan la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuyen la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA, pueden comprender una sustitución en la posición 247 con leucina. La modificación de uno o más aminoácidos, que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA, puede comprender una sustitución en la posición 372 con tirosina. La modificación de uno o más aminoácidos, que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA, puede comprender una sustitución en la posición 326 con ácido glutámico. La modificación de uno o más aminoácidos, que aumenta la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIB pero disminuye la afinidad de la región Fc variante por Fc γ RIIA, puede comprender una sustitución en la posición 224 con leucina.

Las regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por Fc γ RIIB y una afinidad disminuida por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre, pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. También se describen en el presente documento métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmune o

inflamatorio en un sujeto, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la divulgación con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre.

5 También se describen en el presente documento métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende además administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen en el presente documento métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune que además comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.4.2.1 proporciona ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

15 Los ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden tratarse administrando las moléculas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, miocardiopatía, esprue-dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunológica por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia esencial mixta, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, sirosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome Stigman, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/artritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tal como vasculitis dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria y enfermedad crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en el presente documento en la Sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunes están asociados con una afección inflamatoria. Por lo tanto, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Ejemplos de trastornos inflamatorios que se pueden prevenir, tratar o controlar de acuerdo con los métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

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

50 Las moléculas de la divulgación con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre también pueden usarse para prevenir el rechazo de trasplantes.

55 También se describe en el presente documento la modificación de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias, de modo que los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que han sido identificados por los métodos descritos en el presente documento por tener una afinidad mejorada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. En la Tabla 7A se presenta un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que se pueden modificar como se describe en este documento, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención del trastorno autoinmune se presenta en la Tabla 7B.

Tabla 7A: Anticuerpos para enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes que pueden ser modificados

Nombre del Anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de Producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
-----------------------	----------------	------------------	---------	----------------	------------

ES 2 897 506 T3

5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
ANTEGREN ^{MR}	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo de aloinjerto
Anticuerpo anti-CD40L ANTOVA ^{MR}	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Anticuerpo anti-CD40L ANTOVA ^{MR}	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	Selectina E	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevina M	Factor VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Accidente cerebrovascular
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/ Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/Alergia
Infliximab	TNF-afa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	Integrina beta2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Accidente cerebrovascular
LDP-01	Integrina beta2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo de aloinjerto
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Cen teon	Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrtoClon OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
Ortoclon/ OKT3 anti-CD3	CD3	Murino	mIgG2 a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto

RepPro/ Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/ Novartis/Tanox Biosystems	Asma/Alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

Tabla 7B: Anticuerpos para trastornos autoinmunes que pueden ser modificados

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		Anticuerpo contra el antígeno CBL en células T, células B y células NK Anticuerpo completamente humano del Xenorratón
5c8 (Anticuerpo antiligando CD-40)	Los ensayos de fase II se detuvieron en octubre del 99 Examinar "eventos adversos"	CD-40
IDEC 131	Lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	Artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	primatizado; anti-CD80
MEDI-507	Artritis reumatoide; esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn; psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (mAb anti-b7)	Enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad de Crohn; Colitis ulcerosa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
Anticuerpo anti-interferón gamma SMART	Trastornos autoinmunes	Anti-interferón gamma
Verteportina	Artritis reumatoide	
Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
MDX-33	Trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunes	Anticuerpos monoclonal contra receptores de FcRI
	Purpura trombocitopénica idiopática (ITP) anemia hemolítica autoinmune	
MDX-CD4	Trata la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes	Anticuerpo monoclonal contra molécula receptora CD4
VX-497	Trastornos autoinmunes Esclerosis múltiple Artritis reumatoide Enfermedad inflamatoria intestinal lupus psoriasis	inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para elaborar nuevo ARN y ADN usado en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	Artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina-1 beta (que convierte las rutas de controles enzimáticos que conducen a una respuesta inmune agresiva)

VX-745	específico para inflamación involucrado en la señalización química de repuesta inmune inicio y progresión de la inflamación	inhibidor de P38MAP quinasa proteína quinasa activada por mitógenos
Enbrel (etanercept)		Dirige TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL-8 (interleucina 8)
Apogen MP4		Antígeno recombinante selectivamente destruye enfermedades asociadas a células T induce apoptosis Células T eliminadas por muerte celular programada Ya no ataca las propias células del cuerpo específicas los apógenos se dirigen a células T específicas

5.4.2.1 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

5 También se describen en el presente documento métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de moléculas con regiones Fc variantes que tienen una afinidad mejorada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA junto con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE^{MR}, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, mofetil micofenolato, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamindas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de células T y moduladores del receptor de citocinas.

15 Los agentes antiinflamatorios han mostrado éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios y ahora son un tratamiento común y estándar para dichos trastornos. Cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica puede usarse en los métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NESAID), fármacos antiinflamatorios esteroides, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de NESAID incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX^{MR}), diclofenaco (VOLTAREN^{MR}), etodolaco (LODINE^{MR}), fenoprofeno (NALFON^{MR}), indometacina (INDOCIN^{MR}), ceterolaco (TORADOL^{MR}), oxaprozina (DAYPRO^{MR}), nabumentona (RELAFEN^{MR}), sulindac (CLINORIL^{MR}), tolmentina (TOLECTIN^{MR}), rofecoxib (VIOXX^{MR}), naproxeno (ALEVE^{MR}, NAPROSYN^{MR}), ketoprofeno (ACTRON^{MR}) y nabumetona (RELAFEN^{MR}). Dichos NSAID funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroides incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON^{MR}), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE^{MR}), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

5.4.3 Enfermedad infecciosa

30 También se describen en el presente documento métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas descritas en el presente documento. Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o prevenidas por las moléculas descritas en este documento son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

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

45 Las enfermedades bacterianas que se pueden tratar o prevenir usando las moléculas descritas en el presente documento junto con los métodos descritos en el presente documento, que son causadas por bacterias incluyen, pero no se limitan a, micobacterias rickettsia, micoplasma, Neisseria, S. pneumonia, Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), Bacillus anthracis (ántrax), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, pertussis, cólera, peste, difteria, clamidia, S. aureus y Legionella.

Las enfermedades por protozoos que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas descritas en este documento junto con los métodos descritos en este documento, que son causadas por protozoos incluyen, pero no se limitan a, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

- 5 Las enfermedades parasitarias que se pueden tratar o prevenir usando las moléculas descritas en el presente documento junto con los métodos descritos en el presente documento, que son causadas por parásitos incluyen, pero no se limitan a, clamidia y rickettsia.

10 Las moléculas descritas en el presente documento que comprenden regiones Fc variantes tienen una función efectora de anticuerpo mejorada hacia un agente infeccioso, por ejemplo, una proteína patógena, en relación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Las moléculas descritas en el presente documento pueden mejorar la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa mejorando la fagocitosis y/o la opsonización del agente infeccioso que causa la enfermedad infecciosa. Las moléculas descritas en el presente documento mejoran la eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa aumentando la ADCC de las células infectadas que causan la enfermedad infecciosa.

15 Las moléculas descritas en el presente documento se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa. Se contempla el uso de las moléculas descritas en el presente documento en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que se pueden usar en combinación con las moléculas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, macrólidos (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxil (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacin (Floxin®), ciprofloxacina (Cipro®) o norfloxacina (Noroxin®)), antibióticos aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomocina), antibióticos anfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol y florfenicol y tianfenicol), antibióticos de ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampicina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenémicos (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftazopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam) oxacefens (por ejemplo, flomoxef y moxalactam), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamciclina, yodhidrato de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina cero, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilina y fencihicilina de potasio), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclina, clomociclina y deciclina, 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, Brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de los mismos (por ejemplo, cinoxacina, clinafloxacina, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, nopriilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona) cicloserina, mupirocina y tuberina.

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

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

5.5 Terapia de vacuna

60 En el presente documento se describe el uso de una composición de la invención para inducir una respuesta inmune contra un agente antigénico o inmunogénico, incluidos, pero sin limitarse a, antígenos de cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas (ejemplos de los cuales se describen más adelante). En el presente documento se describen composiciones de vacuna que comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos a los que se desea una respuesta inmune, en las que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos se recubren con un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad mejorada por FcγRIIIA. Aunque sin tener la intención de estar ligado por un mecanismo de acción particular, el recubrimiento de un agente antigénico o inmunogénico con una

anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad mejorada por FcγRIIIA, mejora la respuesta inmune al agente antigénico o inmunogénico deseado al inducir respuestas humorales y mediadas por células. Las composiciones de vacuna son particularmente eficaces para provocar una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

5 El agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna puede comprender un virus contra el que se desea una respuesta inmune. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y preferiblemente están atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados se puede realizar usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada que se formulará como se describe en el presente documento. Puede ser preferible una vacuna viva porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar al que ocurre en las infecciones naturales y, por lo tanto, confiere una inmunidad sustancial y duradera. La producción de tales formulaciones de vacuna de virus recombinante vivo se puede lograr usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en la alantoides del embrión de pollo seguido de purificación.

15 El virus recombinante puede no ser patógeno para el sujeto al que se administra. En este sentido, el uso de virus modificados genéticamente con fines de vacuna puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, eliminaciones) en las plantillas utilizadas para la transfección puede proporcionar a los nuevos virus características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones de sentido erróneo específicas que están asociadas con la sensibilidad a la temperatura o la adaptación al frío pueden convertirse en mutaciones por eliminación. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o la temperatura y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas. Se conocen en la técnica tecnologías de ADN recombinante para modificar virus recombinantes. Por ejemplo, en el arte se conocen técnicas para modificar virus de ARN de cadena negativa, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.166.057.

20 Alternativamente, se pueden construir virus quiméricos con características "suicidas" para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Dichos virus pasarían por una o unas pocas rondas de replicación dentro del anfitrión. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante pasaría por un ciclo o ciclos de replicación limitados e induciría un nivel suficiente de respuesta inmune, pero no iría más lejos en el huésped humano y causaría enfermedad. Alternativamente, se pueden formular virus inactivados (muertos). Las formulaciones de vacunas inactivadas se pueden preparar usando técnicas convencionales para "matar" los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están "muertas" en el sentido de que su infectividad ha sido destruida. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar su inmunogenicidad. Para preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede cultivarse en cultivo celular o en la alantoides del embrión de pollo, purificarse por ultracentrifugación zonal, inactivarse con formaldehído o β-propiolactona y combinarse.

30 Los epítomos completamente extraños, incluidos los antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales, pueden modificarse en el virus para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados tales como los antígenos del parásito del VIH (gp160, gp120, gp41) (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales pueden modificarse en la cepa atenuada.

35 Prácticamente cualquier secuencia genética heteróloga puede construirse en los virus quiméricos para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias de genes heterólogos son fracciones y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítomos que inducen una respuesta inmune protectora a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, pueden expresarse por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias de genes heterólogos que se pueden construir en los virus quiméricos incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina neuraminidasa de influenza y parainfluenza y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F de PIV3 humano. Las secuencias de genes heterólogos que pueden modificarse en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina 1, 2, 4, 5, 6, 12 y antagonistas de estos agentes.

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

45 Las composiciones de vacuna pueden comprender un polipéptido de fusión en el que un agente antigénico o inmunogénico se une operativamente a un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad mejorada por FcγRIIIA. La modificación de polipéptidos de fusión para su uso en las composiciones de vacuna se realiza usando métodos de tecnología de ADN recombinante de rutina y está dentro del nivel de la experiencia ordinaria.

50 En el presente documento se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto mediante la administración de una composición de la invención. Preferiblemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto, comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante de la invención, en el que el anticuerpo variante tiene una mayor afinidad por FcγRIIB. Aunque no pretenden estar unidas por un mecanismo de

acción particular, tales composiciones son eficaces para inducir tolerancia activando la ruta inhibidora mediada por FcγRIIB.

5.6 Composiciones y métodos de administración

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

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

La invención también proporciona que los anticuerpos de la invención que comprenden regiones Fc variantes, se envasen en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, los anticuerpos de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Los anticuerpos liofilizados de la invención deben almacenarse entre 2 y 8 °C en su envase original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferiblemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después de ser reconstituídas. En una realización alternativa, los anticuerpos de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de los anticuerpos de la invención se suministra en un recipiente herméticamente cerrado a razón de al menos 1 mg/ml, más preferiblemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

Para los anticuerpos abarcados por la invención, la dosis administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Por tanto, a menudo es posible administrar dosis más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosis y la frecuencia de

administración de los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos pueden reducirse mejorando la captación y la penetración tisular de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

5 En una realización, la dosis de los anticuerpos de la invención administrada a un paciente es de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se usa como terapia de agente único. En otra realización, los anticuerpos de la invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosis administrada a un paciente es menor que cuando dichas moléculas se usan como terapia con un solo agente.

10 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, se debe tener cuidado de utilizar materiales en los que no se absorba la molécula.

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

20 En otra realización más, las composiciones se pueden administrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo la patente de los Estados Unidos No. 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel",
 25 Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una realización, se puede usar una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, citado más arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; y Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); patente de los Estados Unidos No. 5.679.377; patente de los Estados Unidos No. 5.916.597; patente de los Estados Unidos No. 5.912.015; patente de los Estados Unidos No. 5.989.463; patente de los Estados Unidos No. 5.128.326; publicación PCT No. WO 99/15154; y publicación PCT No. WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de vinilo-etilénico), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y polioleésteres. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado más arriba, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). En otra realización, se utilizan composiciones poliméricas útiles tales como implantes de liberación controlada de acuerdo con Dunn et al., (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación generalmente puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo del paciente que necesite tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de administración sostenida no polimérico, mediante el cual se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición al fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida (véase el documento U.S. 5.888.533).

55 Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.526.938; publicaciones internacionales Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; y Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760.

65 Cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de los Estados Unidos No. 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el

5 uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en unión a un péptido similar a un homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarlo dentro del ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación homóloga.

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

15 El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de anticuerpos de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado con anticuerpos de la invención en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas utilizadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento particular.

25 5.6.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden ser utilizadas en la preparación de formas de dosificación unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en este documento o una combinación de esos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En una realización particular, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la invención que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA y/o dicha región Fc variante media una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la invención que comprenden una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante se une a FcγRIIIA con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre que se une a FcγRIIIA, y dicha región Fc variante se une a FcγRIIB con una afinidad menor que una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre se une a FcγRIIB, y/o dicha región Fc variante media una función efectora al menos 2 veces más eficazmente que una molécula comparable que comprende un región Fc de tipo silvestre y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dichas composiciones farmacéuticas comprenden además uno o más agentes anticancerígenos.

50 La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc según se determina de acuerdo con la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden ser empleadas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes

humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

5 Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estériles de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

15 Las composiciones de la invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las formadas con aniones como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5.6.2 Terapia génica

20 Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos de la invención pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o proteína de fusión que media un efecto terapéutico o profiláctico.

25 Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. A continuación se describen ejemplos de métodos.

30 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, *Science* 260: 926 - 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; mayo de 1993, *TIBTECH* 11 (5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

35 Se describe una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica del anticuerpo que codifica los ácidos nucleicos (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438).

45 Se describe una composición de la invención que comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

50 La administración de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o a los vectores portadores de ácido nucleico, o indirectamente, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, luego trasplantado al sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

60 Las secuencias de ácido nucleico se pueden administrar directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de manera que se vuelvan intracelulares, por ejemplo, por infección usando retrovirales u otros vectores virales defectuosos o atenuados (véase la patente de los Estados Unidos No. 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas en unión a un péptido que se sabe que ingresa al

65

núcleo, administrándolo en unión a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432) (que puede usarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. Se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. El ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específicas de la célula, dirigiéndose a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435-438).

Se pueden usar vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, se puede utilizar un vector retroviral (véase Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se utilizará en la terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Se pueden encontrar más detalles sobre los vectores retrovirales en Boesen et al., (1994, Biotherapy 6: 291-302), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr 1* a las células madre hematopoyéticas con el fin de volver las células madre más resistente a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93: 644-651; Klein et al., 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. en Genetics and Devel. 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para transportar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de poder infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson (Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503, 1993, presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., (Human Gene Therapy, 5: 3-10, 1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de los monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld et al., 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68 : 143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91: 225-234; la publicación PCT WO94/12649; y Wang et al., 1995, Gene Therapy 2: 775-783. Pueden usarse vectores de adenovirus.

También se ha propuesto el virus adenoasociado (AAV) para su uso en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 y la patente de los Estados Unidos No. 5.436.146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células en cultivo de tejidos mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células luego se colocan bajo selección para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Luego, esas células se administran a un sujeto.

El ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limitan a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microceldas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en el arte para la introducción de genes extraños en células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; y Clin. Pharma. Ther. 29: 69-92, 1985) y pueden usarse, siempre que no se interrumpan las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden administrar a un sujeto mediante varios métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico con fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible deseado e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

La célula utilizada para la terapia génica puede ser autóloga del sujeto.

5 Cuando se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión pueden introducirse en las células de manera que sean expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran luego *in vivo* para efecto terapéutico. Pueden usarse células madre o progenitoras. Se puede usar potencialmente cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 7 1: 973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A: 229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61: 771).

10 El ácido nucleico que se va a introducir con fines de terapia génica puede comprender un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de modo que la expresión del ácido nucleico pueda controlarse controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

15 5.6.3 Kits

En el presente documento se describe un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con los anticuerpos de la invención (es decir, anticuerpos, polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes). Además, también se pueden incluir en el envase o kit farmacéutico uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. También se describe un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con dicho contenedor o contenedores puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, el cual refleja la aprobación de la agencia para la fabricación, uso o venta para administración humana.

25 Se describen kits que se pueden usar en los métodos anteriores. Un kit puede comprender uno o más anticuerpos de la invención. Un kit puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más envases. Un kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con el cáncer. El otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un compuesto quimioterápico. El agente profiláctico o terapéutico puede ser un compuesto terapéutico biológico u hormonal.

5.7 Caracterización y demostración de utilidad terapéutica

35 Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, o anticuerpos terapéuticos de la invención se prueban preferiblemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular y en un organismo modelo animal, tal como un sistema modelo animal de roedor, para la actividad terapéutica deseada antes de uso en humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica, incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido del paciente se hace crecer en cultivo y se expone o se pone en contacto con una composición farmacéutica de la invención, y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido se puede obtener mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de las moléculas terapéuticas o profilácticas más eficaces para cada paciente individual. Se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos de células implicadas en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado sobre dichos tipos de células.

50 Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema modelo de ratón. Dichos sistemas de modelos se utilizan ampliamente y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos se pueden administrar repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran por separado o como una mezcla.

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

65 Preferiblemente, las mutaciones que muestran los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se probarán para su uso en estudios de modelos animales antes de su uso en seres humanos. Los anticuerpos que albergan los mutantes de Fc identificados usando los métodos descritos en este documento y probados en ensayos de ADCC, que incluyen ch4D5 y ch520C9, dos anticuerpos anti-Erb-B2 y chCC49, un anticuerpo

anti-TAG72, se prefieren para su uso en modelos animales ya que han sido utilizados previamente en el modelo de ratón de xenoinjerto (Hudsiak et al., 1989, Mol. Cell Biol. 9: 1165-72; Lewis et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 37: 255-63; Bergman et al., 2001 Clin. Cancer Res. 7: 2050-6; Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 1387-93). Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en modelos animales usando métodos descritos anteriormente, por ejemplo usando sistemas de expresión de mamíferos y métodos de purificación de IgG descritos y ejemplificados en el presente documento. Un experimento típico requiere al menos aproximadamente 5,4 mg de anticuerpo mutante. Este cálculo se basa en cantidades medias de anticuerpo de tipo silvestre necesarias para proteger de 8 a 10 ratones de 30 g tras una dosis de carga de 4 µg/g y una dosis de mantenimiento semanal, 2 µg/g, durante diez semanas. Se describen líneas de células tumorales como fuente de tumores de xenoinjerto, tales como células SK-BR-3, BT474 y HT29 que se derivan de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto Erb-B2 como receptores de prolactina en su superficie. Las células SK-BR-3 se han utilizado con éxito en modelos de tumores de ADCC y xenoinjertos. En otros ensayos, pueden usarse células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano. Estas células expresan el antígeno TAG72 en la superficie celular y pueden usarse junto con el anticuerpo chCC49. El uso de diferentes anticuerpos y modelos de tumores múltiples evitará la pérdida de cualquier mutación específica debido a una incompatibilidad específica de Fc mutante de un anticuerpo.

Se pueden usar modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana específica de tumor basándose en la afinidad y especificidad de las regiones CDR de la molécula de anticuerpo y la capacidad de la región Fc del anticuerpo para provocar una respuesta inmune (Wu et al., 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales hechos a medida para probar la eficacia de las interacciones Fc-FcγR humanos. Se pueden usar pares de líneas de ratón transgénico FcγRIIIA, FcγRIIB y FcγRIIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer Center) como los que se enumeran en la tabla siguiente.

25

Tabla 5: Cepas de ratones

Antecedente de la cepa	FcR humano
Desnudo/CD16A inactivado	ninguno
Desnudo/CD16A inactivado	FcγRIIIA
Desnudo/CD16A inactivado	FcγR IIA
Desnudo/CD16A inactivado	FcγR IIA y IIIA
Desnudo/CD32B inactivado	ninguno
Desnudo/CD32B inactivado	FcγR IIB

Preferiblemente, los mutantes de Fc que muestran tanto una unión mejorada a FcγRIIIA como una unión reducida a FcγRIIB, una actividad aumentada en ADCC y ensayos de fagocitosis se prueban en experimentos con modelos animales. Los experimentos con modelos animales examinan el aumento de la eficacia de los anticuerpos que portan el mutante Fc en ratones desnudos mCD16A transgénicos para FcγRIIIA en comparación con un control al que se le ha administrado un anticuerpo nativo. Preferiblemente, se examinan grupos de 8-10 ratones usando un protocolo estándar. Un ejemplo de experimento de modelo animal puede comprender las siguientes etapas: en un modelo de cáncer de mama, 2 x 10⁶ células SK-BR-3 se inyectan subcutáneamente el día 1 con 0,1 ml de PBS mezclado con Matrigel (Becton Dickinson). Inicialmente se administra un anticuerpo quimérico de tipo silvestre y un control de isotipo para establecer una curva para la dosis terapéutica predeterminada, inyección intravenosa de 4D5 el día 1 con una dosis inicial de 4 µg/g seguida de inyecciones semanales de 2 µg/g. El volumen del tumor se controla durante 6-8 semanas para medir el progreso de la enfermedad. El volumen del tumor debería aumentar linealmente con el tiempo en los animales inyectados con el control de isotipo. Por el contrario, debería producirse muy poco crecimiento tumoral en el grupo inyectado con 4D5. Los resultados del estudio de dosis estándar se utilizan para establecer un límite superior para los experimentos que prueban los mutantes de Fc. Estos estudios se realizan utilizando dosis subterapéuticas del mutante Fc que contiene anticuerpos. Se usó una décima dosis en modelos de xenoinjerto en experimentos realizados en ratones inactivados para FcγRIIB, véase, Clynes et al., 2000, Nat. Medicina. 6: 443-6, con un bloqueo resultante en el crecimiento de células tumorales. Dado que los mutantes de la invención muestran preferiblemente un aumento en la activación de FcγRIIIA y una reducción en la unión de FcγRIIB, los mutantes se examinan a un décimo de la dosis terapéutica. El examen del tamaño del tumor a diferentes intervalos indica la eficacia de los anticuerpos a la dosis más baja. El análisis estadístico de los datos mediante la prueba t proporciona una forma para determinar si los datos son significativos. Los mutantes de Fc que muestran una mayor eficacia se prueban en dosis cada vez más bajas para determinar la dosis más pequeña posible como medida de su eficacia.

50

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento se puede determinar utilizando varios modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford LJ y Wilder RL, "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al. (Eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También pueden usarse modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

55

Los modelos animales principales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente utilizados incluyen: modelos de rata con artritis inducida por adyuvantes, modelos de rata y ratón con artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster con artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford LJ y Wilder RL, "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, 5
McCarthy et al. (Eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en el presente documento se puede evaluar usando un modelo de rata con artritis inducida por carragenina. La artritis inducida por carragenina también se ha utilizado en conejos, perros y cerdos en estudios de artritis crónica o inflamación. La evaluación histomorfométrica 10
cuantitativa se utiliza para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar tal modelo de artritis inducida por carragenina se describen en Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat," *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se conocen y describen en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenina en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter CA et al., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se ha utilizado como cribado primario *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los NSAID y se considera predictivo de la eficacia humana. La actividad antiinflamatoria de los 20
agentes profilácticos o terapéuticos de prueba se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento en el peso de la pata trasera del grupo de prueba en relación con el grupo de control dosificado con vehículo.

Además, también se pueden usar modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas en el presente documento (Kim et al., 1992, *Scand. J. Gastroentrol.* 27: 529-537; Strober, 1985, *Dig Dis. Sci.* 30 (Supl. 12): 3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humano que pueden inducirse en animales. Los polisacáridos sulfatados que incluyen, pero no se limitan a, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes 25
químicos que incluyen, pero no se limitan a, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético, pueden administrarse a animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

También se pueden usar modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas en el presente documento. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunes tales como diabetes tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders et al., 1999, *Autoimmunity* 29: 235-246; Krogh et al., 1999, *Biochimie* 81: 511- 515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol*, 19: 12-24). 30
35

Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica puede usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias descritas en este documento para enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias. 40

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente divulgación se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede 45
expresar como la relación LD₅₀/DE₅₀. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden usar agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en el método descrito en el presente 50
documento, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de síntomas semimáxima) según se determina en cultivo celular. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta 55
60
resolución.

La actividad anticancerígena de las terapias utilizadas como se describe en este documento también se puede determinar mediante el uso de varios modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como 65
hámsteres, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug*

Development (1999, eds. Fiebig y Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher).

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas de células tumorales que pueden usarse como fuente de tumores de xenoinjerto incluyen, pero no se limitan a, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores tanto de erbB2 como de prolactina. Las células SKBR3 se han utilizado de forma rutinaria en la técnica como modelos de tumores de ADCC y xenoinjertos. Alternativamente, las células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano se pueden usar como fuente de tumores de xenoinjerto.

Las composiciones de la invención se prueban preferiblemente *in vitro*, y luego *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes y métodos terapéuticos pueden seleccionarse utilizando células de un tumor o una línea celular maligna. Se pueden usar muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de ³H-timidina, por recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul de tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente en función de cambios en la morfología, disminución del crecimiento y/o formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en la preparación de la membrana basal tridimensional o la matriz extracelular, etc.

Los compuestos para uso en terapia se pueden probar en sistemas de modelos animales adecuados antes de probarlos en humanos, incluidos, pero sin limitarse a, en ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Luego, los compuestos pueden usarse en los ensayos clínicos apropiados.

Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica puede usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias descritas en este documento para el tratamiento o la prevención del cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmune.

6. Ejemplos

Usando un sistema de presentación en levadura, se cribaron regiones Fc de cadena pesada de IgG1 humana mutante para determinar la afinidad modificada por diferentes receptores Fc. En particular, se generó una biblioteca Fc mutante mediante PCR propensa a errores (Genemorph, Stratagene), y luego las proteínas Fc mutantes se fusionaron con la proteína de la pared celular Aga2p, lo que permitió que la proteína de fusión se secretara extracelularmente y se mostrara en la pared celular de la levadura.

Se clonaron formas solubles de los receptores humanos (FcγRIIIA y FcγRIIB). Sin embargo, la detección de los dominios Fc de IgG1 en la superficie de la célula de levadura se ve obstaculizada debido a la baja afinidad de FcγR por su ligando. Para eludir esta limitación, se formaron complejos tetraméricos de FcγR solubles usando una secuencia de AVITAG que podría biotinilarse enzimáticamente y posteriormente reaccionar con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SA-PE; Molecular Probes) para formar complejos de FcγR tetraméricos solubles. Los ensayos ELISA confirmaron que los complejos tetraméricos de FcγR solubles tenían una mayor avidéz por la IgG1 humana en relación con el FcγR monomérico. Las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura también se unieron a los complejos tetraméricos FcγR solubles según se evaluó mediante análisis de FACS.

La unión diferencial de las proteínas de fusión Fc expresadas en la superficie de la célula de levadura a los complejos FcγR tetraméricos solubles se controló mediante un análisis de FACS. Se identificaron así proteínas de fusión Fc con afinidades alteradas por uno o más complejos FcγR tetraméricos solubles y luego se incorporaron en una inmunoglobulina completa y se expresaron en células de mamífero. El producto expresado en mamíferos se usó en ensayos ELISA para confirmar los resultados obtenidos en el sistema de presentación de la superficie de la levadura. Finalmente, se secuenciaron las regiones Fc mutantes para confirmar el residuo o residuos alterados.

6.1 Clonación, expresión y purificación de materiales y métodos de FcγRIIIA

Se clonaron FcγRIIB y FcγRIIIA solubles como sigue. Se obtuvieron los clones de ADNc para los genes FcγR humanos (FcγRIIB y FcγRIIIA) (obsequio del laboratorio Ravetch). La región soluble del gen de FcγRIIIA (aminoácidos 7 - 203) se amplificó mediante PCR (Tabla 5), se digirió con BamHI/HindIII y se ligó en el vector pET25 (Novagen). Este vector se digirió con Sall/NotI y se aisló en gel un fragmento de 370. El vector hu3A, (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/Sall y se aisló un fragmento de 270 que contenía el extremo terminal N de FcγRIIIA. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 cortado con BamHI/NotI para crear pcDNA3-PcγPIIIA (aminoácidos 1-203). La región soluble de FcγRIIB (aminoácidos 33 - 180) se amplificó mediante PCR (Tabla 5), se digirió con BglII/HindIII y se ligó en pET25b (+) (Novagen). Este vector se digirió con BamHI/NotI y se aisló en gel un fragmento de 140 pb. El vector huRIIB1 (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI y se aisló un fragmento FcγRIIB del terminal N de 440 pb. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 cortado con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcγRIIB (aminoácidos 1- 180). Se

transfectaron clones recombinantes en células 293H, se recogieron los sobrenadantes de cultivos celulares y se purificaron proteínas FcγR recombinantes solubles (rFcγR) en una columna de IgG sefarosa.

Resultados

5 Se purificaron FcγRIIIA soluble recombinante (rFcγRIIIA) y FcγRIIB soluble recombinante (rFcγRIIB) hasta homogeneidad

10 Después de la expresión y purificación de las proteínas FcγR solubles recombinantes en una columna de IgG sefarosa, se determinaron la pureza y el peso molecular aparente de las proteínas receptoras solubles purificadas recombinantes mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la FIG. 1, el rFcγRIIIA soluble (Figura 1, carril 1) tenía el peso molecular aparente esperado de ~ 35 KDa y el rFcγRIIB soluble (Figura 1, carril 4) tenía el peso molecular aparente esperado de ~ 20 KDa. Como se muestra en la FIG. 1, el rFcγRIIIA soluble migra como una banda "borrosa" difusa que se ha atribuido al alto grado de glicosilación que se encuentra normalmente en FcγRIIIA (Jefferis, et al., 1995 Immunol Lett. 44, 111-117).

6.1.1 Caracterización de FcγRIIIA soluble recombinante purificado

Materiales y métodos

20 Se analizó rFcγRIIIA soluble purificado, que se obtuvo como se describió anteriormente, para determinar la unión directa contra IgG monomérica o agregada humana usando un ensayo ELISA. La placa se recubre con 10 ng de rFcγRIIIA soluble durante la noche en 1X PBS. Posteriormente al recubrimiento, la placa se lava tres veces en 1X PBS/Tween 20 al 0,1%. Se agrega IgG humana, ya sea IgG monomérica biotinilada o IgG agregada biotinilada, a los pocillos en una concentración que varía de 0,03 mg/ml a 2 mg/ml, y se dejó que se uniera al rFcγRIIIA soluble. La reacción se lleva a cabo durante una hora a 37 °C. La placa se lava de nuevo tres veces con 1X PBS/Tween 20 al 0,1%. La unión de IgG humana a rFcγRIIIA soluble se detecta con conjugado de estreptavidina peroxidasa de rábano picante controlando la absorbancia a 650 nm. La absorbancia a 650 nm es proporcional a la IgG agregada unida.

30 En un experimento ELISA de bloqueo, se controla la capacidad de un anticuerpo monoclonal FcγRIIIA, 3G8, un anticuerpo anti-FcγRIIIA de ratón (PharMingen), para bloquear la unión del receptor a la IgG agregada. Las condiciones de lavado e incubación fueron las mismas que las descritas anteriormente, excepto que antes de la adición de IgG, se añadió un exceso molar de 5 veces de 3G8 y se dejó incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Resultados

El FcγRIIIA soluble recombinante purificado se une específicamente a IgG agregada.

40 Se ensayó la unión directa de FcγRIIIA soluble recombinante purificado a IgG agregada y monomérica usando un ensayo ELISA (Figura 2). A una concentración de IgG de 2 μg/ml, se observó una fuerte unión a la IgG agregada. Sin embargo, a una concentración similar, no se detectó unión a la IgG monomérica. La unión a IgG agregada fue bloqueada por 3G8, un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA de ratón que bloquea el sitio de unión del ligando, lo que indica que la unión de IgG agregada es a través del sitio de unión del ligando FcγRIIIA normal (Figura 2). También se caracterizó el rFcγRIIB soluble y se demostró que se une a IgG con características similares a las del rFcγRIIIA soluble (datos no mostrados).

6.2 Formación de materiales complejos tetraméricos FcγR solubles y métodos

Construcción de plásmidos para la expresión de FcRγIIIA y FcRγIIB solubles fusionados al péptido A VITAG.

50 Para generar complejos tetraméricos de FcγR solubles, la región soluble del gen de FcRgIIIA humano (aminoácidos 7-203) se amplificó mediante PCR (Tabla 1), se digirió con BamHI/HindIII y se ligó en el pET25b (+) (Novagen). Este vector se digirió con Sall/NotI y se aisló un fragmento de 370 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector hu3A, (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/Sall, y se aisló un fragmento de 270 pb que contenía el extremo terminal N de FcRγIIIA. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1 (Invitrogen), que se había digerido con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcRgIIIA (aminoácidos 1-203).

60 La región soluble de FcRγIIB (aminoácidos 33 - 180) se amplificó mediante PCR (Tabla I), se digirió con BglII/HindIII y se ligó en pET25b (+) (Novagen). Este vector se digirió con BamHI/NotI y se aisló un fragmento de 140 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. El vector huRIIB1 (obsequio de J. Ravetch) se digirió con BamHI/EcoRI y se aisló un fragmento 440 del terminal N de FcRγIIB. Ambos fragmentos se coligaron en pcDNA3.1, que se había digerido con BamHI/NotI para crear pcDNA3-FcRγIIB (aminoácidos 1-180). Posteriormente, la secuencia del enlazador-AVITAG se fusionó con el extremo terminal C de FcγRIIIA y FcγRIIB. Para generar los constructos FcγRIIIA-enlazador-avitag y FcγRIIB-enlazador-avitag, los constructos pcDNA3.1 FcγRIIIA y FcγRIIB se digirieron con NotI y XbaI (ambos cortados en la secuencia del vector) y un oligonucleótido bicatenario de 86 pares de bases que consiste en el sitio NotI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3' se ligaron en el vector. Este fragmento de 86 pb se generó hibridando dos oligonucleótidos de complemento inverso fosforilados en 5' (mostrados en la Tabla 8 como cebadores enlazador.avitag

5' y 3') con los sitios de restricción para NotI y XbaI ya premodificados. Se mezclaron volúmenes iguales de cada cebador a 100 ng por μ l y el ADN se calentó a 90 °C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante una hora para hibridación. Esto creó un fragmento de ADN bicatenario listo para ser ligado a los constructos pcDNA3.1-Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IIB digeridos con las respectivas enzimas. Por lo tanto, se construyeron pcDNA3.1-Fc γ R1IIIA-enlazador-AVITAG y pcDNA3.1-Fc γ R1IIB-linker-AVITAG.

Tabla 8: Cebadores utilizados para la construcción de vectores Fc γ R e IgG

Oligómero	Secuencia
5' enlazador.avitag (SEQ. ID NO. 1)	GGCCGCAGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTCTGAACGACATCTT
3' enlazador.avitag (SEQ. ID NO. 2)	CGAGGCTCAGAAAA TCGAATGGCACGAATGAT CTAGATCATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCAG AACCACCACCACCAGAACCACCACCACCTGC
FcR1IIIA izquierdo (SEQ. ID NO. 3)	G TTG GAT CCT CCA ACT GCT CTG CTA CTT CTA GTT T
FcR1IIIA derecho (SEQ. ID NO. 4)	GAA AAG CTT AAA GAA TGA TGA GAT GGT TGA CAC T
FcR1IIB derecho (SEQ. ID NO. 5)	GAA GTC GAC AAT GAT CCC CAT TGG TGA AGA G
FcR1IIB izquierdo (SEQ. ID NO. 6)	G TTA GAT CTT GCT GTG CTA TTC CTG GCT CC
IgG1 derecho (SEQ. ID NO. 7)	ATA GTC GAC CAC TGA TTT ACC CGG AGA
IgG1 izquierdo (SEQ. ID NO. 7)	GGAA TTC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT
mcr025; chl (f) (SEQ. ID NO. 9)	AAA GGATCC GCG AGC TCA GCC TCC ACC AAG G
H021 (SEQ. ID NO. 10)	GTCTGCTCGAAGCATTAACC

Biotinilación por BirA

Los receptores Fc solubles (Fc γ R) fusionados a la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos (Avidity, CO) (Schatz PJ, 1993, Biotechnology, 11: 1138-1143) en el extremo terminal C de la proteína clonada en pcDNA3.1 fueron generados transfectando transitoriamente células 293H usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA). Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se purificaron las proteínas FcR solubles pasando los sobrenadantes sobre una columna de IgG sefarosa. La concentración de la proteína de fusión soluble FcR-AVITAG se cuantificó mediante absorbancia a 280 nm. El AVITAG presente en las proteínas FcR solubles se biotiniló de acuerdo con el protocolo del fabricante (Avidity, CO) con la enzima BirA de *E. coli*, una biotina ligasa. Se añadió a la mezcla una dilución final 1: 100 de un cóctel de inhibidores de proteasa (catálogo Sigma # P8849) y una concentración final de 1 mg/ml de leupeptina (Sigma L-8511) para evitar la degradación de las proteínas. La reacción de BirA se incubó a temperatura ambiente durante la noche, después de lo cual la solución se concentró usando un dispositivo de ultrafiltración Biomax 10K (Millipore) mediante centrifugación a 3500 rpm a 4 °C. La proteína se cargó en una columna FPLC Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech) en Tris-HCl (20 mM, pH 8,0), NaCl 50 mM para separar el Fc γ R soluble marcado de la biotina libre.

Determinación del grado de biotinilación mediante ensayo de desplazamiento de estreptavidina

Aproximadamente el 80-85% de la proteína fue biotinilada por la enzima BirA (Avidity, CO). Se utilizó el ensayo de desplazamiento de estreptavidina para determinar el grado de biotinilación de la proteína. La proteína biotinilada se incubó con estreptavidina (PM 60.000 Daltons) en diferentes proporciones. La proteína no biotinilada sola y la estreptavidina sola se incluyen como controles para determinar el grado de biotinilación. La incubación se lleva a cabo en hielo durante 2 horas o durante la noche a 4 °C. Las muestras se analizan en un SDS-PAGE Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen, CA) con agente reductor y sin hervir las muestras. La proteína biotinilada unida a estreptavidina migra como una banda de alto peso molecular. El grado de biotinilación se estima por la cantidad de proteína monomérica que queda en la muestra. La ausencia de especies monoméricas de bajo peso molecular y la presencia de un complejo con un peso molecular mayor que la estreptavidina sola indica un alto grado de biotinilación.

Formación de complejos tetraméricos Fc γ R

La formación de complejos tetraméricos Fc γ R se realizó de acuerdo con metodologías previamente establecidas para tetrameros del MHC de clase I (véase Busch, DH et al., 1998 Immunity 8: 353-362; Altman, JD et al., 1996, Science 274: 94- 96). La concentración del Fc γ R monomérico biotinilado se calculó con base en la absorbancia a 280 nm. Una molécula de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (Molecular Probes, Or) tiene la capacidad de unir 4 moléculas de biotina. Se usó una relación molar de 5: 1 de Fc γ R biotinilado monomérico a SA-PE (Fc γ R biotinilado monomérico 5X:

1X SA-PE) para asegurar un exceso de proteína biotinilada. El peso molecular calculado de SA-PE es 300.000 Daltons, por lo tanto, 303 ml de una solución de 1 mg/ml de estreptavidina-PE tienen 1 nmol de SA-PE, que se añadió a 5 nmoles de proteína. La formación eficiente de proteína tetramérica requiere que se agregue SA-PE en incrementos escalonados. La mitad de la cantidad de SA-PE se añadió al principio y el SA-PE restante se añadió en pequeñas alícuotas cada 20-30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Los intervalos para la adición del SA-PE restante son flexibles. Una vez completada la adición de SA-PE, la solución se concentró y se cargó en una columna de exclusión por tamaño de FPLC como anteriormente en solución salina tamponada con fosfato, a pH 7,4. Se recogió la fracción que eluyó en el volumen vacío con un peso molecular mayor que SA-PE solo. Se repusieron los inhibidores de proteasa para evitar la degradación de las proteínas. La solución se concentró y se añadieron inhibidores de proteasa adicionales al complejo final para su almacenamiento. La concentración final del complejo tetramérico de FcγR soluble se calculó con base en la concentración inicial de la proteína monomérica biotinilada. Por ejemplo, si se usaron 500 μg de proteína biotinilada para hacer el complejo tetramérico y los tetrámeros concentrados finales estaban en un volumen de 500 μl, la concentración se estima en aproximadamente 1 mg/ml (las pérdidas incurridas durante la concentración no se toman en cuenta dado que es difícil determinar con precisión cuánto se pierde durante cada etapa de la formación de los tetrámeros. Tampoco es posible tomar una absorbancia a 280 nm para medir la concentración debido a la interferencia del PE). Se dispensaron complejos tetraméricos de FcγR solubles en pequeñas alícuotas a -80 °C para almacenamiento a largo plazo con inhibidores de proteasa. No se añadió azida de sodio a estas preparaciones ya que los tetrámeros se usaron para cribar una biblioteca de presentación en levadura. Al descongelar una alícuota, los tetrámeros se almacenaron a 4 °C durante hasta 1 semana.

Ensayo ELISA para caracterizar los complejos tetraméricos de FcγR

Se utilizó un ELISA para caracterizar los complejos tetraméricos de FcγR. La placa de pocillos MaxiSorb F96 (Nunc) se recubrió con 25 ng de IgG humana en tampón PBS y se incubó durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS/BSA al 0,5%/Tween 20 al 0,1% (tampón de lavado y dilución) antes de agregar la combinación de tetrámeros de FcγRIIIA y anticuerpos de prueba para determinar el bloqueo con 3G8, un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA humano como se describe a continuación: la etapa de bloqueo se realizó de la siguiente manera: se preincubaron tetrámeros de FcγRIIIA solubles a una concentración final fija de 0,5 mg/ml con anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente en tampón, PBS/BSA al 0,5%/Tween 20 al 0,1%. Las concentraciones finales de los anticuerpos oscilaron entre 60 mg/ml y 0,25 mg/ml. 3G8 es un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA humano y, para el propósito de este experimento, se utilizó una versión quimérica, es decir, la región variable del anticuerpo es un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA humano y la región constante de las cadenas ligera y pesada es de la región de IgG1 humana. También se usó D265A 4.4.20 quimérico en este experimento, que es un anticuerpo anti-fluoresceína, de modo que la región Fc contiene una mutación en la posición 265, en la que un ácido aspártico se sustituye con alanina en la IgG1 humana, lo que da como resultado una unión reducida a FcγR. Este anticuerpo se ha caracterizado previamente (véase Clynes et al., 2000, Nat. Med. 6: 443-446; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276: 6591-6604). Este anticuerpo se utilizó como control de isotipo negativo.

Se dejó que los anticuerpos se unieran a tetrámeros de FcγRIIIA, mediante preincubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, la mezcla se añadió a la IgG en la placa lavada y se incubó durante una hora más a temperatura ambiente. La placa se lavó con tampón y se añadió DJ130c (un anticuerpo de ratón anti-FcγRIIIA humano disponible a través de DAKO, Dinamarca; su epítipo es distinto al del anticuerpo 3G8) a una dilución 1: 5000 y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar los tetrámeros de FcγRIIIA unidos. Los anticuerpos no unidos se lavaron con tampón y el DJ130c unido se detectó con peroxidasa de cabra anti-ratón (laboratorios Jackson). Este reactivo no detectará el Fc humana. Después de lavar el anticuerpo no unido conjugado con peroxidasa, se añadió el sustrato, reactivo TMB (BioFfx), para detectar el grado de bloqueo con 3G8 frente al control de isotipo y se leyó el color revelado a 650 nm.

Para la unión directa de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG mediante ELISA, se recubrieron placas MaxiSorb con 25 ng de IgG como se describió anteriormente. El FcγRIIIA soluble tetramérico se añadió de 20 mg/ml a 0,1 mg/ml y el FcγRIIIA tetramérico soluble monomérico biotinilado se añadió a concentraciones que variaban de 20 mg/ml a 0,16 mg/ml. La detección fue la misma que la anterior con DJ130c, seguida de anticuerpo de cabra anti-peroxidasa de ratón. Se desarrolló color con el reactivo TMB y se leyó la placa a 650 nm.

Resultados

El complejo tetramérico soluble de FcγRIIIA se une a la IgG humana monomérica a través de su sitio normal de unión al ligando.

Se generaron, aislaron y analizaron proteínas de fusión FcγRIIIA-AVITAG solubles como se describe en la sección Material y métodos usando un ensayo ELISA y se demostró que tenían propiedades similares a las de la proteína FcγRIIIA soluble no AVITAG (datos no mostrados). Las proteínas de fusión se biotinilaron y los complejos tetraméricos se generaron como se describió anteriormente.

A continuación, se evaluó el complejo tetramérico de FcγR soluble para la unión de su ligando, IgG humana monomérica, usando un ensayo ELISA. El análisis por ELISA mostró que los complejos tetraméricos solubles de FcγR se unen específicamente a la IgG humana monomérica. Como se muestra en la Figura 3A, la unión de FcγRIIIA

tetramérico soluble a IgG humana monomérica está bloqueada por 3G8, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FcγRIIIA humano, según se controla mediante la absorbancia a 650 nm. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal 4-4-20 que alberga la mutación D265A no fue capaz de bloquear la unión de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana monomérica (Figura 3A). Este experimento confirma así que la unión del complejo tetramérico soluble FcγRIIIA se produce a través del sitio de unión del ligando nativo.

El complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble se une a la IgG humana monomérica con mayor avidéz que el FcγRIIIA soluble monomérico

Se evaluó la unión directa de FcγRIIIA tetramérico soluble a IgG humana agregada usando un ensayo ELISA y se comparó con la unión directa de FcγRIIIA monomérico soluble a IgG humana monomérica. Como se muestra en la Figura 3B, el FcγRIIIA tetramérico soluble se une a la IgG humana con una mayor avidéz (8-10 veces) que el receptor monomérico soluble, según se controla mediante la absorbancia a 450 nm.

La unión del complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble también se ensayó usando perlas magnéticas recubiertas con Fragmento Fc purificado a partir de IgG1 (Figura 4). El complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble se une a las perlas recubiertas con Fc de IgG1, en condiciones en las que no se detecta la unión del monómero. La especificidad de la unión se demostró preincubando el complejo receptor, con un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA, LNK16, que bloquea la unión de Fc. Este ensayo confirma además que el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble se une a la IgG monomérica a través de su sitio de unión de ligando normal, y la avidéz del receptor aumenta debido a los múltiples sitios de unión dentro del complejo.

6.3 Construcción de la cepa de levadura para presentación de dominios mutantes de Fc de IgG1

Materiales y métodos

El vector pYD1 (Invitrogen) se deriva directamente de un vector de replicación de levadura, pCT302 (Shusta, et al., 2000 Nat. Biotechnol. 18: 754-759), que se ha utilizado con éxito para presentar receptores de células T y un número de scFV. Este plásmido es centromérico y alberga el gen TRP1 que permite un número de copias relativamente constante de 1-2 plásmidos por célula en una cepa de levadura *trp1*. La clonación direccional en el polienlazador coloca el gen de interés bajo el control del promotor *GAL1* y en marco con *AGA2*. La fusión del dominio Fc de IgG con la levadura Aga2p da como resultado la secreción extracelular de la proteína de fusión Aga2-Fc y la posterior presentación de la proteína Fc en la pared celular mediante enlaces disulfuro a la proteína Aga 1p de levadura, que es una proteína integral de la pared celular.

Para optimizar los niveles de presentación, se amplificaron mediante PCR diferentes fragmentos de la cadena pesada de IgG1 y se clonaron en pYD1. Específicamente, la región Fc de la cadena pesada de IgG1 (alotipo IG1m (a); aminoácidos 206-447) se amplificó mediante PCR (Tabla 1) del clon IMAGE 182740, se digirió con EcoRI/SalI y se ligó en el vector pYD1 (Invitrogen). El clon inicial de IMAGE contenía una eliminación de un solo nucleótido en la posición 319 que se corrigió mediante mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* para construir pYD-GIF206 (Quickchange, Stratagene).

El fragmento CH1-CH3 (aminoácidos 118-447) se amplificó a partir del clon de cadena pesada del MAb B6.2 en el vector pCINEO usando un oligo 5' (mcr025:chl(f)) y un oligo 3' (H021) (véase la Tabla 8). El fragmento se digirió con BamHI/NotI y se ligó en el vector pYD1 para construir pYD-CH1.

La Figura 5, muestra una presentación esquemática de los constructos. El constructo CH1-CH3 contiene el dominio CH1 además de los dominios bisagra-CH2-CH3 de la cadena pesada, GIF206 contiene 6 residuos de aminoácidos secuencia arriba de la bisagra y GIF227 comienza dentro de la región bisagra en un sitio de escisión proteolítica endógena (Jendeborg et al., 1997 J. Immunol. Meth. 201: 25 - 34).

6.4 Inmunolocalización y caracterización de dominios Fc en la pared de la célula de levadura

Materiales y métodos

Los constructos que contienen las proteínas de fusión Aga2p-Fc y un vector de control, pYDI, que carece de cualquier inserto, se transformaron en la cepa de levadura EBY100 (Invitrogen), *MATa ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4 :: HIS3 prb1 Δ1.6R can1 GAL: : GAL-AGA1*, usando un protocolo estándar de transformación de levadura con acetato de litio (Gietz et al., 1992 Nucleic Acids Res. 20: 1425). Posteriormente, se seleccionaron protótrofos de triptófano en medios definidos. La amplificación de poblaciones de células independientes y la inducción de Aga2p y las proteínas de fusión Aga2p-Fc se lograron mediante crecimiento en glucosa, seguido de crecimiento en medio que contenía galactosa como fuente de carbono primaria durante 24-48 horas a 20 °C. El crecimiento en galactosa induce la expresión de las proteínas de fusión Aga2-Fc a través del promotor *GAL1*, que posteriormente conduce a la presentación de las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura.

Resultados

Análisis de FACS de proteínas de fusión Fc

La expresión de las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura se analizó mediante inmunotinción usando un anticuerpo de cabra anti-FcγR humano F(ab)₂ policlonal conjugado con PE y anticuerpo HP6017 (Sigma) (Jackson Immununoresearch Laboratories, Inc.). La microscopía de fluorescencia muestra tinción periférica para las tres proteínas de fusión Fc. La cepa de control, que alberga el vector solo, muestra poca o ninguna tinción (datos no mostrados). Se utilizó el análisis de FACS para cuantificar la tinción (Figura 6). La cepa de levadura que contiene la fusión CH1-CH3 demostró el mayor porcentaje de células teñidas con ambos anticuerpos (Figura 6B y F). El constructo GIF227 mostró la mayor intensidad de fluorescencia media (Figura 6, paneles C y G).

Caracterización de la unión de proteínas de Fusión Fc expresadas en la superficie de las células de levadura

El contexto natural de las proteínas Fc y FcγR coloca al receptor en la superficie celular y al Fc como ligando soluble; sin embargo, la presentación en la superficie de Fc de levadura invierte la geometría de la interacción natural. La detección de las proteínas Fc de IgG1 en la superficie de la pared celular de la levadura se complica tanto por la baja afinidad del FcγR por su ligando como por la geometría inversa inherente al sistema de presentación. Aunque este último punto no se puede alterar, la avidéz del ligando se mejoró como se explicó anteriormente formando complejos tetraméricos de FcγR solubles, lo que permite la detección de la unión de FcγR a las proteínas de fusión Fc expresadas en la superficie de la pared celular de levadura.

Para caracterizar la unión de los complejos FcγR tetraméricos solubles a las proteínas de fusión Fc presentadas en la superficie, se incubaron células de levadura que expresan diferentes constructos Fc con el complejo tetramérico soluble rFcγRIIIA y se analizaron mediante FACS. Las células de levadura que albergan pYD-CH1, que presentan el constructo CH1-CH3 de tipo silvestre, se unieron mediante el complejo tetramérico de rFcγRIIIA soluble como se muestra mediante el análisis de FACS. Las cepas GIF206 y GIF227, sin embargo, mostraron poca o ninguna unión al complejo tetramérico de rFcγRIIIA soluble como se muestra por análisis de FACS (datos no mostrados).

Se han identificado mutaciones en la región Fc que bloquean la unión a los FcγR (Shields et al., 2001; J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Una de estas mutaciones, D265A, se incorporó en pYD-CH1 y este mutante se expresó en la superficie de la célula de levadura. Estas células se incubaron con el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble usando una alta concentración de ligando (0,15 mM de Fc; 7,5 mM de D265A). El análisis de FACS indicó que el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble se unía al Fc de tipo silvestre (Figura 7A) pero el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble no se unió al mutante D265A-Fc, lo que indica que FcγR está interactuando con el sitio de unión normal de FcR en la región inferior CH2 de bisagra (Figura 7B).

Los anticuerpos contra el sitio de unión del ligando FcγRIIIA bloquearon la unión del complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble a la proteína Fc de tipo silvestre presentada en la pared de la superficie de la célula de levadura, como se analizó mediante FACS (Figura 8). La unión del complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble fue bloqueada por el anticuerpo 3G8, así como el anticuerpo LNK16, otro anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA (Advanced Immunological) (Tam et al., 1996, J. Immunol. 157, 1576-1581) y no fue bloqueado por un control de isotipo irrelevante. Por lo tanto, la unión del complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble a las proteínas Fc mostradas en la superficie de la célula de levadura se produce a través del sitio normal de unión al ligando. La unión limitada del complejo tetramérico de FcγRIIIA indica que una subpoblación de células tiene un Fc plegado correctamente que es accesible a FcγR. Existen numerosas razones por las que solo una subpoblación de células puede unirse al ligando, por ejemplo, pueden estar en diferentes etapas del ciclo celular o las proteínas de fusión pueden no haberse exportado.

Para determinar la constante de disociación de la unión del tetrámero de FcγRIIIA a las proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura, se analizó la unión de un intervalo de complejo tetramérico de FcγRIIIA usando FACS. El complejo tetramérico de FcγRIIIA se tituló a concentraciones de 1,4 μM a 0,0006 μM. Usando la intensidad de fluorescencia media como una medida de la afinidad de unión y el análisis de regresión no lineal, se determinó que la K_D era 0,006 μM (+/- 0,001) (datos no mostrados).

6.5 Construcción de la biblioteca de Fc mutante

Se construyó una biblioteca de Fc mutante usando cebadores que flanquean el fragmento Fc en el constructo Fc-CH1 y PCR propensa a errores (Genemorph, Stratagene). El inserto CH1-CH3 en el vector pYD-CHI se amplificó usando una PCR mutagénica (Genemorph, Stratagene). Se llevaron a cabo cinco reacciones utilizando los cebadores pYD secuencia arriba y pYD secuencia abajo (Invitrogen). El fragmento amplificado resultante se digirió con XHOI/BamHI y se ligó en pYD1. A continuación, la reacción de ligación se transformó en células ultracompetentes XL10 (Stratagene), que dieron como resultado ~ 1 x 10⁶ transformantes, conteniendo el 80% de los transformantes insertos.

El análisis de secuencia de 28 plásmidos aleatorios de la biblioteca indicó una frecuencia de mutación de ~2-3 mutaciones/kb con una ruptura del 40% de cambios de nucleótidos conservados y el 60% de las mutaciones que dan como resultado cambios de aminoácidos.

La biblioteca se transformó en la cepa de levadura EBY100, MAT α *ura3-52 trp I leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4::HIS3 prb1 Δ 1.6R can I GAL GAL-AGA 1::URA3* con una alta eficiencia, $\sim 3,3 \times 10^5$ transformantes/ μ g, en 30 reacciones de transformación independientes para crear un total de $\sim 10^7$ transformantes de levadura (Gietz, et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 1425). La biblioteca se reunió y amplificó mediante crecimiento en glucosa.

5

6.6 Selección y análisis de materiales y métodos de Fc mutantes

Ensayo ELISA para el cribado de mutantes de Fc

Se recubrieron placas de ELISA (inmunoplasmas Nunc F96 MaxiSorb) con 50 ml/pocillo de 0,5 mg/ml de BSA-FITC en tampón de carbonato a 4 °C y se dejaron incubar durante la noche. Las placas se lavaron con 1X PBS/Tween 20 al 0,1% (PBST) 3 veces. Se añadieron 200 ml/pocillo de PBST/BSA al 0,5% y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces más con PBST. Se agregaron 50 ml/pocillo de anticuerpo 4-4-20 diluido 1:4 (aproximadamente 3 mg/ml que daría lugar a una concentración final de 0,7-0,8 mg/pocillo), ya sea de tipo silvestre o que contenga un mutante Fc, del medio condicional en PBST/BSA al 0,5% y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. Se añadió Fc γ RIIIA monomérico biotinilado purificado a razón de 3 mg/ml (en PBST/BSA al 0,5%) (50 μ l/pocillo) a las placas y se dejó incubar durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. Se añadieron 50 ml/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina-HRP (Pharmacia, RPN 123v) en PBST/BSA al 0,5% y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST tres veces. A continuación, se añadieron a las placas 80 ml/pocillo de reactivo TMB (BioFX) y se dejaron incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Las reacciones se detuvieron finalmente añadiendo 40 ml/pocillo de solución de parada (ácido sulfúrico 0,18 M). A continuación, se controló la absorbancia de las placas a 450 nm. Después del primer cribado, los candidatos interesantes se confirmaron adicionalmente mediante titulación en serie de mutantes 4-4-20-Fc en el ELISA de unión basado en inmunocomplejos. Se realizaron algunas modificaciones en este ELISA. Para revestir las placas, se utilizaron 2 mg/ml de BSA-FITC. Según los resultados de la cuantificación de IgG, se añadió 4-4-20-Fc diluido (tipo silvestre o mutantes) del medio condicional hasta una concentración final de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,063 y 0 mg/ml en PBST/BSA al 0,5%.

30 Cribado de FACS para las proteínas Fc presentadas en la superficie celular

Las células se cultivaron en al menos 10 ml de HSM-Trp-Ura pH 5,5 con glucosa durante 16-24 horas o hasta que la DO₆₀₀ fue superior a 2,0. Las células se centrifugaron a ~ 2000 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en un volumen igual de HSM-Trp-Ura, pH 7,0 con galactosa. En un matraz de 125 ml se agregaron 36 ml de medio de galactosa y se inoculó con 9 ml de cultivo, el cual se incubó a 20 °C con agitación durante 24-48 h. El crecimiento se controló midiendo la DO₆₀₀ a intervalos de 8 a 16 horas. Las células se recolectaron a 2K rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en un volumen igual de 1X PBS, pH 7,4.

40 Cribado de equilibrio: se incubó una cantidad apropiada de células mientras se mantenía un exceso de ligando. Por ejemplo, se prefiere comenzar con un número de células necesarias para asegurar una cobertura de 10 veces la biblioteca. Para la primera clasificación con una biblioteca que contiene 10^7 transformantes, se deben usar 10^8 células. De hecho, es mejor comenzar con 10^9 células para compensar la pérdida durante el protocolo de tinción.

45 La incubación se realizó típicamente en un tubo de 1,5 ml en volúmenes de 20-100 ml durante 1 hora a 4 °C en la oscuridad en un rotador (tampón de incubación: 1X PBS pH 7,4; 1 mg/ml de BSA). Las células se lavaron una vez en 500 ml de tampón de incubación y se centrifugaron a 4 K rpm durante 2,5 minutos. Las células se resuspendieron en 100 ml de tampón de incubación y se incubaron con el segundo reactivo de tinción. Para Fc-CH1, se puede usar un anticuerpo de cabra anti-hFc F(ab)₂-FITC anti-hFc F(ab)₂ (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) para teñir la expresión de CH1. La tinción se realizó con 1 ml durante 30 minutos. Las células se lavaron adicionalmente en 500 ml de tampón de incubación y se centrifugaron a 4 K rpm durante 2,5 minutos, se resuspendieron en 1 ml 1X PBS 1 mg/ml de BSA y se analizaron mediante FACS.

55 En la Tabla 9 se muestran los cuadrantes de clasificación de cribado de equilibrio típicas y el número de células recogidas.

Tabla 9. Puertas de clasificación y número de células clasificadas

Clasificación	Puerta	células totales cribadas	células recolectadas
1era	5%	10^8	5×10^6
2nda	1%	10^7	1×10^5
3era	0,2%	10^7	2×10^4
4ta	0,2%	10^7	2×10^4

Después de las clasificaciones 3 y 4, las células se sembraron directamente en placas de -trp-ura para identificar mutantes individuales. Esto típicamente recuperó entre 200 y 400 colonias por placa. Después de la recolección, las

células se colocaron en 10 ml de medio de glucosa en un tubo cónico de 50 ml y se cultivaron a 30 °C. Todo el procedimiento se repitió de forma iterativa.

Resultados

5 Análisis de FACS de mutantes de Fc

10 Después de la inducción en medio de galactosa, las células se recogieron y se tiñeron conjuntamente con complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble - marcado con PE y F(ab₂) de anti-Fc humano de ratón marcado con FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Las células se analizaron mediante FACS y se usaron cuadrantes de clasificación para seleccionar las células que mostraban la mayor afinidad por el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble en relación con la cantidad de expresión de Fc en la superficie celular (Figura 9). Por ejemplo, una célula que contiene un Fc mutante que se une mejor al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble puede expresar menos proteínas de fusión Fc en la superficie de la célula de levadura, y esta célula estará en la esquina inferior izquierda del cuadrante de clasificación.

15 Se realizaron cuatro clasificaciones consecutivas para enriquecer aquellos mutantes que mostraban la mayor afinidad por el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble. Los cuadrantes para cada clasificación sucesiva fueron 5,5%, 1%, 0,2% y 0,1%. Después de la última clasificación, las células se sembraron en medio selectivo y se aislaron colonias individuales. Cada colonia individual representaba una población clonal de células que albergaban un único mutante Fc dentro de la proteína de fusión Aga2-Fc. Inicialmente, se seleccionaron 32 colonias independientes y se ensayaron mediante FACS para determinar su unión al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble (Figura 10). Dieciocho mutantes mostraron un aumento en la intensidad de unión medida por el porcentaje de células unidas por el complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble y la intensidad de fluorescencia media de las células unidas.

20 También se ensayaron mutaciones que mostraban un aumento en la unión a FcγRIIIA para determinar la unión al complejo tetramérico de FcγRIIB soluble (Figura 10). La mayoría de las mutaciones que conducen a un aumento en la unión al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble también dieron como resultado la detección de la tinción del complejo tetramérico de FcγRIIB (Figura 10). Con base en datos físicos y genéticos previos, se espera que algunas mutaciones que aumentan la unión a FcγRIIIA también aumenten la unión a FcγRIIB (Shields et al., 2001, J Biol.Chem. 276: 6591-6604; Sondermann et al., 2000, Nature 406: 267-273).

25 Análisis de mutantes en un MA b 4-4-20 producido en una línea celular humana

35 El aislamiento y análisis de mutaciones en el sistema de levadura permite una rápida identificación de nuevos alelos mutantes. El uso de un sistema heterólogo para aislar mutaciones podría resultar en la identificación de mutaciones que mejoran la unión a través de una alteración que da como resultado un plegamiento incorrecto o una alteración en la glicosilación que es específica de la levadura. Para analizar las mutaciones de Fc en una molécula de inmunoglobulina que se produce en células humanas, los mutantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, que contenía la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antilfluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem, 257 (12): 6987-6995). Las cadenas pesadas mutantes 4-4-20 se coexpresaron transitoriamente con los clones de cadenas ligeras en la línea celular de riñón humano (293H). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante ELISA (Figura 11).

40 De acuerdo con el ensayo ELISA, la mayoría de los mutantes que se identificaron con una afinidad mejorada por el complejo FcγRIIIA monomérico soluble, en el análisis de FACS secundario, también mostraron un aumento en la unión al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble cuando estaban presentes en la región Fc del anticuerpo monoclonal 4-4-20 producido en la línea celular humana (Figura 11A). Sin embargo, dos mutantes, el número 16 y el número 19, mostraron una disminución en la unión al complejo monomérico soluble de FcγRIIIA.

50 La Tabla 10 resume las mutaciones que se han identificado y sus correspondientes características de unión a FcγRIIIA y FcγRIIB, según se determina mediante ensayos basados en presentación en levadura y ELISA. En la Tabla 6, los símbolos representan lo siguiente: • corresponde a un aumento de 1 vez en la afinidad; + corresponde a un aumento del 50% en la afinidad; - corresponde a una disminución de 1 vez en la afinidad; → corresponde a ningún cambio en la afinidad en comparación con una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre.

Tabla 10: Mutaciones identificadas y características de unión

Clon #	Sitios de mutación	Dominio	Unión de IIIA	Unión de IIB
4	A339V, Q347H	CH2, CH3	+	+
5	L251P, S415I	CH2, CH3	+	+
7	Aga2p-T43I	Nota: Esta es una mutación en Aga2P que mejora la presentación		Aga2p- T43I
8	V185M, K218N, R292L, D399E	CH1, bisagra, CH2, CH3	ningún cambio	-
12	K290E, L142P	CH1, CH2	+	no probado

ES 2 897 506 T3

16	A141V, H268L, K288E, P291S	CH1, CH2	-	no probado
19	L133M, P150Y, K205E, S383N, N384K	CH1, CH2, CH3	-	no probado
21	P396L	CH3	•	•+
25	P396H	CH3	•••	••
6	K392R	CH3	ningún cambio	ningún cambio
15	R301C, M252L, S192T	CH1, CH2	-	no probado
17	N315I	CH2	ningún cambio	no probado
18	S132I	CH1	ningún cambio	no probado
26	A162V	CH1	ningún cambio	no probado
27	V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T	CH1, Ch2	+	+
29	H310Y, T289A, G337E	CH2	-	no probado
30	S119F, G371S, Y407N, E258D	CH1, CH2, CH3	+	ningún cambio
31	K409R, S166N	CH1, CH3	ningún cambio	no probado
20	S408I, V215I, V125I	CH1, bisagra, CH3	+	ningún cambio
24	G385E, P247H	CH2, CH3	•••	+
16	V379M	CH3	••	ningún cambio
17	S219Y	Bisagra	•	-
18	V282M	CH2	•	-
31	F275I, K334N, V348M	CH2	+	ningún cambio
35	D401V	CH3	+	ningún cambio
37	V280L, P395S	CH2	+	-
40	K222N	Bisagra	•	ningún cambio
41	K246T, Y319F	CH2	•	ningún cambio
42	F243I, V379L	CH2, CH3	•+	-
43	K334E	CH2	•+	-
44	K246T, P396H	CH2, CH3	•	••+
45	H268D, E318D	CH2	•+	••••
49	K288N, A330S, P396L	CH2, CH3	••••	•••
50	F243L, R255L, E318K	CH2	•	-
53	K334E, T359N, T366S	CH2, CH3	•	ningún cambio
54	I377F	CH3	•+	+
57	K334I	CH2	•	ningún cambio
58	P244H, L358M, V379M, N384K, V397M	CH2, CH3	•+	•+
59	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2, CH3	•+	ningún cambio
61	I377F (aislado independiente)	CH3	•••	••+
62	P247L	CH2	••	••+
64	P217S, A378V, S408R	Bisagra, CH3	••	••••+
65	P247L, I253N, K334N	CH2	•••	••+
66	K288M, K334E	CH2	•••	-
67	K334E, E380D	CH2, CH3	•+	-
68	P247L (aislado independiente)	CH2	+	••••
69	T256S, V305I, K334E, N390S	CH2, CH3	•+	ningún cambio
70	K326E	CH2	•+	••+
71	F372Y	CH3	+	••••+
72	K326E (aislado independiente)	CH2	+	••
74	K334E, T359N, T366S (aislado independiente)	CH2, CH3	••	ningún cambio
75	K334E (aislado independiente)	CH2	••+	ningún cambio
76	P396L (aislado independiente)	CH3	•+	ningún cambio
78	K326E (aislado independiente)	CH2	••	•••+
79	K246I, K334N	CH2	•	••••
80	K334E (aislado independiente)	CH2	•	ningún cambio
81	T335N, K370E, A378, T394M, S424L	CH2, CH3	•	ningún cambio
82	K320E, K326E	CH2	•	•

84	H224L	Bisagra	•	••••
87	S375C, P396L	CH3	•+	••••+
89	E233D, K334E	CH2	•+	ningún cambio
91	K334E (aislado independiente)	CH2	•	ningún cambio
92	K334E (aislado independiente)	CH2	•	ningún cambio
94	K334E, T359N, T366S, Q386R	CH2	•	ningún cambio

El análisis de la unión del complejo tetramérico de FcγRIIB soluble muestra que 7 de los 8 mutantes que mostraron un aumento en la unión al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble también tuvieron una mayor unión al complejo tetramérico de FcγRIIB soluble (Figura 11B). Un mutante, el número 8, mostró una disminución en la unión al complejo tetramérico de FcγRIIB soluble. Tres de los mutantes no muestran diferencias en la unión al complejo tetramérico de FcγRIIIA soluble o al complejo tetramérico de FcγRIIB soluble, posiblemente debido a mutaciones que dan como resultado alteraciones específicas de levadura.

6.7 Ensayo de ADCC de mutantes de Fc

Preparación de células efectoras: Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Pharmacia, 17-1440-02) a partir de sangre humana periférica normal (Biowhittaker/Poietics, 1W-406). La sangre se envió el mismo día a temperatura ambiente y se diluyó 1: 1 en PBS y glucosa (1 g/l) y se colocó en capas sobre Ficoll en tubos cónicos de 15 ml (3 ml de Ficoll; 4 ml de PBS/sangre) o tubos cónicos de 50 ml (15 ml: Ficoll; 20 ml de PBS/sangre). La centrifugación se realizó a 1500 rpm (400 rcf) durante 40 minutos a temperatura ambiente. La capa de PBMC se retiró (aproximadamente 4-6 ml de un tubo cónico de 50 ml) y se diluyó 1:10 en PBS (que no contiene Ca²⁺ o Mg²⁺) en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante diez minutos adicionales a 1200 rpm (250 rcf) a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en 10-12 ml de PBS (que no contiene Ca²⁺ o Mg²⁺), se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron durante otros 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en un volumen mínimo (1-2 ml) de medio (medio de Isocove (IMDM) + suero bovino fetal al 10% (FBS), Gln 4 mM, penicilina/estreptomina (P/S)). Las PBMC resuspendidas se diluyeron al volumen apropiado para el ensayo de ADCC; se realizaron diluciones al doble en una placa ELISA de 96 pocillos (Inmunoplaaca Nunc F96 MaxiSorb). El rendimiento de PBMC fue de aproximadamente 3-5x10⁷ células por 40-50 ml de sangre completa.

Preparación de células diana: las células diana utilizadas en el ensayo fueron SK-BR-3 (número de acceso de ATCC HTB-30; Trempe et al., 1976, Cancer Res. 33-41), Raji (número de acceso de ATCC CCL-86; Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-40), o células Daudi (número de acceso de ATCC CCL-213; Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10) (resuspendidas en 0,5 ml de medio IMDM) y se marcaron con quelato de europio bis(acetoximetil)2,2": 6',2"-terpiridina-6,6'-dicarboxilato (reactivo BATDA; reactivo DELFIA de Perkin Elmer; C136-100). Se usaron células K562 (número de acceso de ATCC CCL-243) como células de control para la actividad NK. Las células Daudi y Raji se centrifugaron; las células SK-BR-3 se tripsinizaron durante 2-5 minutos a 37 °C, CO₂ al 5% y el medio se neutralizó antes de centrifugarlo a 200-350 G. El número de células diana utilizadas en los ensayos fue de aproximadamente 4 -5 x 10⁶ células y no excedió de 5 x 10⁶, ya que la eficacia de la marcación fue mejor con tan solo 2 x 10⁶ células. Una vez que se centrifugaron las células, se aspiró el medio hasta 0,5 ml en tubos Falcon de 15 ml. Se añadieron 2,5 µl de reactivo BATDA y la mezcla se incubó a 37 °C, CO₂ al 5% durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces en 10 ml de PBS y sulfinpirazol 0,125 mM ("SP"; SIGMA S-9509); y dos veces en 10 ml de medio de ensayo (medio celular + sulfinpirazol 0,125 mM). Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de ensayo, se contaron y se diluyeron.

Cuando se usaron células SK-BR-3 como células diana después del primer lavado con PBS/SP, se aspiró el PBS/SP y se añadieron 500 µg/ml de FITC (PIERCE 461110) en medio IMDM que contenía SP, Gln, y P/S y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5%. Las células se lavaron dos veces con medio de ensayo; se resuspendieron en 1 ml de medio de ensayo, se contaron y diluyeron.

Opsonización de anticuerpos: una vez que se prepararon las células diana como se describió anteriormente, se opsonizaron con los anticuerpos apropiados. En el caso de variantes de Fc, se añadieron 50 µl de 1x10⁵ células/ml a una concentración 2x del anticuerpo que alberga la variante de Fc. Las concentraciones finales fueron las siguientes: la concentración final de Ch-4-4-20 fue de 0,5-1 µg/ml; y la concentración final de Ch4D5 fue 30 ng/ml-1 ng/ml.

Se añadieron células diana opsonizadas a células efectoras para producir una relación efector: diana de 75: 1 en el caso de los anticuerpos 4-4-20 con variantes de Fc. En el caso de los anticuerpos Ch4D5 con variantes de Fc, se logró una relación efector: diana de 50: 1 o 75: 1. El gradiente efectivo de PBMC para el ensayo varía de 100: 1 a 1: 1. La liberación espontánea (SR) se midió añadiendo 100 µl de medio de ensayo a las células; la liberación máxima (MR) se midió añadiendo TX-100 al 4%. Las células se centrifugaron a 200 rpm en una centrifuga Beckman durante 1 minuto a temperatura ambiente a 57 G. Las células se incubaron durante 3-3,5 horas a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 1000 rpm en una centrifuga Beckman (aproximadamente 220 xg) durante cinco minutos a 10 °C. Se recogieron 20 µl de sobrenadante; se añadieron 200 µl de solución de Eu y la mezcla se

agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente a 120 rpm en un agitador rotatorio. La fluorescencia se cuantificó en un fluorómetro de resolución temporal (Victor 1420, Perkin Elmer)

Resultados

5 Como se describió anteriormente, las regiones Fc variantes se subclonaron en un vector de expresión de mamífero, que contenía la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz et al., 1982 J. Biol. Chem, 257). (12): 6987-6995). Las cadenas pesadas de 4-4-20 variante se coexpresaron transitoriamente con los clones de cadenas ligeras en la línea celular de riñón humano (293H). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron usando el ensayo de ADCC. La Figura 12 muestra que la actividad de ADCC de los mutantes depende de la concentración. Como se resume en la Tabla 8, cinco inmunoglobulinas con regiones Fc variantes tenían una actividad de ADCC mejorada en relación con la ch 4-4-20 de tipo silvestre. Los cinco mutantes fueron los siguientes: MGFc-27 (G316D, A378V, D399E); MGFc-31 (P247L, N421K); MGFc-10 (K288N, A330S, P396L); MGFc-28 (N315I, V379M, T394M); MGFc-29 (F243I, V379L, G420V).

15 Se ensayaron inmunoglobulinas 4-4-20 adicionales con regiones Fc variantes para determinar su actividad de ADCC en relación con una inmunoglobulina 4-4-20 con una región Fc de tipo silvestre. Estos resultados se resumen en la Tabla 11.

20 Los ensayos de ADCC también se llevaron a cabo usando el mismo protocolo que se describió anteriormente para el anticuerpo 4-4-20, sin embargo, las regiones Fc variantes se clonaron en un anticuerpo humanizado (Ab4D5) que es específico para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu). En este caso, se utilizaron células SK-BR-3 como células diana que se opsonizaron con un anticuerpo HER2/neu que porta una región Fc variante. HER2/neu se expresa de forma endógena por las células SK-BR-3 y, por lo tanto, está presente en la superficie de estas células. La Figura 13 muestra la actividad de ADCC de anticuerpos HER2/neu que portan regiones Fc variantes. La Tabla 12 resume los resultados de la actividad de ADCC de los mutantes en el contexto del anticuerpo HER2/neu. La normalización se llevó a cabo comparando la concentración del anticuerpo mutante con respecto al de tipo silvestre requerido para un valor específico de porcentaje de lisis celular.

30 Como se muestra en la Figura 13A, los mutantes MGFc-5 (V379M), MGFc-9 (P243I, V379L), MGFc-10 (K288N, A330S, P396L), MGFc-13 (K334E, T359N, T366S) y MGFc-27 (G316D, A378V, D399E) que se clonaron en el anticuerpo anti-HER2/neu humanizado exhibieron un % de lisis específica mayor de células SK-BR-3 en relación con el anticuerpo silvestre.

35

Tabla 11. Resumen de la actividad ADCC de mutantes

Etiqueta	Ref	Variación de aminoácido	ADCC			
			1 µg/ml		0,5 µg/ml	
			% de lisis específica	Normalizada	% de lisis específica	Normalizada
MgFc- 27	2C4	G316D, A378V, D399E	33%	2,24	22%	3,60
MgFc- 31	3B9	P247L, N421K	30%	2,05	17%	2,90
MgFc- 10	1E1	K288N, A330S, P396L	24%	1,66	10%	1,67
			<u>% de lisis específica</u>	<u>Normalizada</u>	<u>% de lisis específica</u>	<u>Normalizada</u>
MgFc-28	2C5	N315I, V379M, T394M	20%	1,37	10%	1,69
MgFc-29	3D11	F243I, V379L, G420V	20%	1,35	7%	1,17
Ch4-4-20 (P54008)			15%	1,00	6%	1,00
MgFc-35	3D2	R255Q, K326E	11%	0,79	3%	0,53
MgFc-36	3D3	K218R, G281D, G385R	10%	0,67	5%	0,78
MgFc-30	3A8	F275Y	9%	0,64	2%	0,37
MgFc- 32	3C8	D280E, S354F, A431D, L441I	9%	0,62	4%	0,75
MgFc-33	3C9	K317N, F423 eliminado	3%	0,18	-1%	-0,22
MgFc-34	3C10	F241L, E258G	-1%	-0,08	-4%	-0,71
MgFc-26		D265A	1%	0,08	-3%	-0,45

Tabla 12: Resumen de mutantes

Variante De Fc	Cambios de aminoácido	FcR3A, $K_D/K_{desactivación}$	FcR2B, $K_D/K_{desactivación}$	Unión a IIIA por ELISA	Unión a IIIB por ELISA	Fagocitosis (mutante/WT)	ADCC de 4-4-20 (mutante/wt)	ADCC anti-HER2 (mutante/wt)
Wt	ninguno	198/0,170	94/0,94	1	1	1	1	1
MGFc 5	V379M	160/0,167	70/0,10	2X	N/C	0,86	2,09	1,77
MGFc 9	P24I, V379L	99,7/0,105	120/0,113	1,5X	reducida	?	2,25	2,04
MGFc 10	K288N, A330S, P396L	128/0,115	33,4/0,050	5X	3X	1,2	2,96	2,50
MGFc 11	F243L, R255L	90/0,075	74,7/0,09	1X	reducida	0,8	2,38	1,00
MGFc 13	K334E, T359N, T366S	55,2/0,128	72/0,11	1,5X	N/C	[-	1,57	3,67
MGFc 14	K288M, K334E	75,4/0,1	95,6/0,089	3X	reducida	[-	1,74	
MGFc 23	K334E, R292L	70,2/0,105	108/0,107			[-	2,09	1,6
MGFc 27	G316D, A378V, D399E	72/0,117	46/0,06	1,5X	14X	1,4	3,60	6,88
MGFc 28	N315I, A379M, D399E			1X	9X	1,37	1,69	1,00
MGFc 29	P243I, V379L, G420V	108/0,082	93,4/0,101	2,5X	7X	0,93	1,17	1,00
MGFc 31	P247L, N421K	62/0,108	66/0,065	3X	N/C	1,35	2,90	1,00
MGFc 37	K248M	154/0,175	100/0,091	1,4X	reducida	0,98	3,83	0,67
MGFc 38	K392T, P396L	84/0,104	50/0,041	4,5X	2,5X	1,4	3,07	2,50
MGFc 39	E293V, Q295E, A327T	195/0,198	86/0,074	1,4X	reducida	1,5	4,29	0,50
MGFc 40	K248M	180/0,186	110/0,09	1,4X	reducida	1,14	4,03	
MGFc 41	H268N, P396L	178/0,159	46,6/0,036	2,2X	4,5X	1,96	2,24	0,67
MGFc 43	Y319F, P352L, P396L	125/0,139	55,7/0,041	3,5X	2X	1,58	1,09	

6.8 Análisis de parámetros cinéticos de mutantes de Fc

Los parámetros cinéticos de la unión de anticuerpos ch4-4-20 que albergan mutantes de Fc a FcγRIIIA y FcγRIIB se analizaron usando un ensayo BIAcore (BIAcore Instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.). El FcγRIIIA usado en este ensayo era una proteína monomérica soluble, la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia enlazadora-AVITAG como se describe en la Sección 6.2 mencionada más arriba. El FcγRIIB usado en este ensayo era una proteína dimerica soluble preparada de acuerdo con la metodología descrita en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/439.709 presentada el 13 de enero de 2003. Brevemente, el FcγRIIB usado fue el dominio extracelular de FcγRIIB fusionado al dominio bisagra-CH2-CH3 de IgG2 humana.

Se inmovilizó BSA-FITC (36 µg/ml en tampón de acetato 10 mM a pH 5,0) en una de las cuatro celdas de flujo (celda de flujo 2) de la superficie de un chip sensor mediante química de acoplamiento de amina (mediante modificación de grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de modo que se inmovilizaron aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) de BSA-FITC en la superficie. Después de esto, los ésteres activos que no habían reaccionado se "protegieron" con una inyección de Et-NH2 1 M. Una vez que se preparó una superficie adecuada, los anticuerpos ch 4-4-20 que portaban las mutaciones Fc se pasaron sobre la superficie mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. El nivel de anticuerpos ch-4-4-20 unidos a la superficie osciló entre 400 y 700 RU. A continuación, se inyectaron en la superficie una serie de diluciones del receptor (FcγRIIIA y proteína de fusión FcγRIIB-Fc) en tampón HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, EDTA 3 mM, pH 7,4) a razón de 100 µl/min. La regeneración de anticuerpos entre diferentes diluciones de receptor se llevó a cabo mediante inyecciones únicas de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM pH 9,4; NaCl 3 M.

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

Una vez que se recogió un conjunto de datos completo, las curvas de unión resultantes se ajustaron globalmente usando algoritmos informáticos proporcionados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto $K_{\text{asociación}}$ como $K_{\text{disociación}}$, a partir de los cuales se deduce la constante de unión de equilibrio aparente, K_D , como la relación de las dos constantes de velocidad (es decir, $K_{\text{disociación}}/K_{\text{asociación}}$). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el Manual de Software de BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

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

Resultados

La Fig. 14 muestra la captura de anticuerpos ch 4-4-20 con regiones Fc mutantes en el chip sensor inmovilizado con BSA-FITC. Se inyectaron 6 µl de anticuerpos a una concentración de aproximadamente 20 µg/ml a 5 µl/min sobre la superficie de BSA-FITC. La Fig. 15 es un sensograma de unión en tiempo real de FcγRIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes. La unión de FcγRIIIA se analizó a una concentración de 200 nM y las respuestas de la señal de resonancia se normalizaron al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo silvestre. Los parámetros cinéticos para la unión de FcγRIIIA a anticuerpos ch-4-4-20 se obtuvieron ajustando los datos obtenidos a dos concentraciones de FcγRIIIA diferentes, 200 y 800 nM (Figura 16). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo con base en los valores de $K_{\text{disociación}}$ calculados para las curvas de disociación en el intervalo 32-34 segundos. K_D y $K_{\text{disociación}}$ representan el promedio calculado a partir de las dos concentraciones diferentes de FcγRIIIA utilizadas. La Fig. 17 es un sensograma de unión en tiempo real de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc a anticuerpos ch-4-4-20 que portan regiones Fc variantes. La unión de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc se analizó a una concentración de 200 nM y las respuestas de la señal de resonancia se normalizaron al nivel de la respuesta obtenida para el anticuerpo ch-4-4-20 de tipo silvestre. Los parámetros cinéticos para la unión de la proteína de fusión FcγRIIB-Fc a los anticuerpos ch-4-4-20 se obtuvieron ajustando los datos obtenidos a dos concentraciones de proteína de fusión FcγRIIB-Fc diferentes, 200 y 400 nM (Figura 18). La línea continua representa el ajuste de asociación que se obtuvo con base en la $K_{\text{disociación}}$ calculada para las curvas de disociación en el intervalo 32-34 segundos. K_D y $K_{\text{disociación}}$ representan el promedio de las dos concentraciones de proteína de fusión FcγRIIB-Fc diferentes utilizadas.

Los parámetros cinéticos ($K_{\text{asociación}}$ y $K_{\text{disociación}}$) que se determinaron a partir del análisis BIAcore se correlacionaron con la característica de unión de los mutantes determinada por un ensayo ELISA y la actividad funcional de los mutantes determinada en un ensayo de ADCC. Específicamente, como se observa en la Tabla 13, los mutantes que tenían una actividad de ADCC mejorada en relación con la proteína de tipo silvestre y tenían una unión mejorada a FcγRIIIA según lo determinado por un ensayo ELISA tenían una $K_{\text{disociación}}$ mejorada para FcγRIIIA (es decir, una

$K_{\text{disociación}}$ más baja). Por lo tanto, es probable que un valor de $K_{\text{disociación}}$ más bajo para FcγRIIIA para una proteína Fc mutante en relación con una proteína de tipo silvestre tenga una función de ADCC mejorada. Por otro lado, como se observa en la Tabla 14, los mutantes que tenían una actividad de ADCC mejorada en relación con la proteína de tipo silvestre y tenían una unión reducida para la proteína de fusión FcγRIIB-Fc según lo determinado por un ensayo ELISA tenían una $K_{\text{disociación}}$ más alta para la proteína de fusión FcγRIIB-Fc.

Por tanto, los valores de $K_{\text{disociación}}$ para FcγRIIIA y FcγRIIB pueden usarse como medidas predictivas de cómo se comportará un mutante en un ensayo funcional tal como un ensayo de ADCC. De hecho, se representaron las proporciones de los valores de $K_{\text{disociación}}$ para FcγRIIIA y la proteína de fusión FcγRIIB-Fc de los mutantes con respecto a la proteína de tipo silvestre frente a los datos de ADCC (Figura 19). Específicamente, en el caso de los valores de $K_{\text{disociación}}$ para FcγRIIIA, la relación de $K_{\text{disociación}}(\text{wt})/K_{\text{disociación}}(\text{mutante})$ se representó frente a los datos de ADCC; y en el caso de los valores de $K_{\text{disociación}}$ para FcγRIIB, se representó la relación de $K_{\text{disociación}}(\text{mut})/K_{\text{disociación}}(\text{wt})$ frente a los datos de ADCC. Los números superiores a uno (1) muestran una tasa de disociación menor para FcγRIIIA y una tasa de disociación mayor para FcγRIIB -Fc en relación con el tipo silvestre. Los mutantes que caen dentro del recuadro indicado tienen una tasa de disociación más baja para la unión de FcγRIIIA y una tasa de disociación más alta para la unión de FcγRIIB -Fc, y poseen una función de ADCC mejorada.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la unión de FcRIIIa a ch4-4-20Ab obtenidos por "ajuste separado" de curvas de unión de 200 nM y 800 nM

Ch4-4-20Ab	BIACore Kd, nM	$K_{\text{asociación}}$ 1/Ms	$K_{\text{disociación}}$, 1/s	ELISA, DO	ADCC, %
Wt(0225)	319	$6,0 \times 10^5$	0,170	0,5	17,5
Mut11(0225)	90	$8,22 \times 10^5$	0,075	0,37	32
Mut5(0225)	214	$8,2 \times 10^5$	0,172	0,75	26
Mut6(0225)	264	$6,67 \times 10^5$	0,175	0,6	23
Mut8(0225)	234	$8,3 \times 10^5$	0,196	0,5	22
Mut10(0225)	128	$9,04 \times 10^5$	0,115	1,0	41
Mut12(0225)	111	$1,04 \times 10^6$	0,115	1,0	37
Mut15(0225)	67,9	$1,97 \times 10^6$	0,133	1,0	15
Mut16(0225)	84,8	$1,60 \times 10^6$	0,133	1,0	15
Mut18(0225)	92	$1,23 \times 10^6$	0,112	1,0	28
Mut25(0225)	48,6	$2,05 \times 10^6$	0,1	1,0	41
Mut14(0225)	75,4	$1,37 \times 10^6$	0,1	1,1	28
Mut17(0225)	70,5	$1,42 \times 10^6$	0,1	1,25	30
Mut19(0225)	100	$1,20 \times 10^6$	0,120	0,75	11
Mut20(0225)	71,5	$1,75 \times 10^6$	0,126	0,5	10
Mut23(0225)	70,2	$1,43 \times 10^6$	0,105	1,25	25

Los mutantes resaltados no se ajustan al grupo de acuerdo con los datos de ELISA o ADCC.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la unión de FcRIIB-Fc a ch4-4-20Ab de tipo silvestre y mutante obtenidos por "ajuste separado" de curvas de unión de 200 nM y 800 nM

Ch4-4-20Ab	BIACore Kd, nM	$K_{\text{asociación}}$ 1/Ms	$K_{\text{disociación}}$, 1/s	ELISA, DO	ADCC, %
Wt(0225)	61,4		0,085	0,4	17,5
Mut11(0225)	82,3		0,1	0,08	32
Mut5(0225)	50		0,057	0,6	26
Mut6(0225)	66,5		0,060	0,35	23
Mut8(0225)	44,2		0,068	0,25	22

Mut10(0225)	41,3		0,05	1,2	41
Ch4-4-20Ab	BIAcore Kd, nM	$K_{\text{asociación}}$ 1/MS	$K_{\text{disociación}}$, 1/s	ELISA, DO	ADCC, %
Mut12(0225)	40,1		0,051	0,4	37
Mut15(0225)	37,8		0,040	1,55	15
Mut16(0225)	40		0,043	1,55	15
Mut18(0225)	51,7		0,043	1,25	28
Mut25(0225)			0,112	0,08	41
Mut14(0225)	95,6		0,089	0,13	28
Mut17(0225)	55,3		0,056	0,38	30
Mut19(0225)	45,3		0,046	1,0	11
Mut20(0225)	24,1		0,028	0,8	10
Mut23(0225)	108		0,107	0,1	25

6.9 Cribado de mutantes de Fc utilizando varias rondas de enriquecimiento utilizando un ensayo de fase sólida

5 Las siguientes cribados de mutantes tenían como objetivo identificar conjuntos adicionales de mutantes que muestran una unión mejorada a Fc γ RIIIA y una unión reducida a Fc γ RIIB. El cribado secundario de variantes de Fc seleccionadas se realizó mediante ELISA seguido de la prueba de ADCC en el sistema de 4-4-20. A continuación, los mutantes se seleccionaron principalmente basándose en su capacidad para mediar la ADCC a través de 4-4-20 usando células SK-BR3 recubiertas con fluoresceína como dianas y PBMC aisladas de donantes humanos como población de células efectoras. Los mutantes de Fc que mostraron un aumento relativo en ADCC, por ejemplo, una mejora por un factor de 2, se clonaron en chAb anti-HER2/neu o anti-CD20 y se probaron en un ensayo de ADCC usando las células tumorales apropiadas como dianas. Los mutantes también se analizaron mediante BIAcore y se determinó su $K_{\text{disociación}}$ relativa.

15 Cribado 1: Agotamiento secuencial de la fase sólida y selección usando perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIB seguido de selección con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIIA. El objetivo de este cribado fue la identificación de mutantes de Fc que ya no se unen a Fc γ RIIB o muestran una unión reducida a Fc γ RIIB. Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca sin tratamiento previo ($\sim 10^7$ células) con perlas magnéticas ("My One", Dynal) recubiertas con Fc γ RIIB. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida colocando el tubo que contenía la mezcla en un campo magnético. Las células de levadura que no estaban unidas a las perlas se retiraron y se colocaron en medio fresco. A continuación, se unieron a perlas que se recubrieron con Fc γ RIIIA. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida colocando el tubo que contiene la mezcla en un campo magnético. Se eliminó la levadura no unida y las células unidas se eliminaron mediante agitación vigorosa tipo vórtice. Las células recuperadas se volvieron a cultivar en medio que contenía glucosa y se volvieron a inducir en medio selectivo que contenía galactosa. Se repitió el proceso de selección. A continuación, se utilizó el cultivo final para recolectar ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron mediante PCR y se clonaron en 4-4-20. Se seleccionaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ensayos ELISA y ADCC de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 15.

30 Tabla 15: Mutantes seleccionados por agotamiento secuencial en fase sólida y selección usando perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIB seguido de selección con perlas magnéticas recubiertas con Fc γ RIIIA.

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

35 Cribados 2 y 3: mutantes seleccionados por FACS, cribado de equilibrio y cinético: el primer cribado de biblioteca identificó una mutación en la posición 396, cambiando el aminoácido prolina por leucina (P396L). Esta variante de Fc mostró un aumento de la unión tanto a Fc γ RIIIA como a Fc γ RIIB. Se construyó una segunda biblioteca utilizando P396L como línea de base. Se usó mutagénesis por PCR para generar $\sim 10^7$ mutantes, cada uno de los cuales contenía la mutación P396L y contenía cambios de nucleótidos adicionales. La biblioteca P396L se examinó usando dos conjuntos de condiciones.

40 Se realizó un cribado de equilibrio usando Fc γ RIIIA-enlazador-avitag biotinilado como monómero, usando métodos ya descritos. Se incubó aproximadamente un exceso de 10 veces de la biblioteca (10^8 células) en 0,5 ml de Fc γ RIIIA

aproximadamente 7 nM durante 1 hora. La mezcla se clasificó mediante FACS, seleccionando el 1,2% superior de aglutinantes. Se cultivaron células de levadura seleccionadas en medio selectivo que contenía glucosa y se reindujeron en medio selectivo que contenía galactosa. El cribado de equilibrio se repitió por segunda vez y el cuadrante de clasificación se estableció para recoger el 0,2% superior de aglutinantes. A continuación, las células de levadura seleccionadas se cultivaron en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó luego para recolectar ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de 4-4-20 usando métodos ya descritos. Se cribaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ELISA y ADCC de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Mutantes seleccionados por FACS usando un cribado de equilibrio con concentraciones de FcR11IA de aproximadamente 7 nM.

Mutante	Cambios de aminoácido
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L
MgFc44	K334N, P396L
MgFc46	P217S, P396L
MgFc47	K210M, P396L
MgFc49	K261N, K210M, P396L
MgFc60	P217S, P396L

También se implementó un cribado cinético para identificar mutantes con $K_{\text{disociación}}$ mejorada en la unión a FcγR11IA. Se establecieron condiciones para cribar la biblioteca P396L usando una cepa con la variante Fc de P396L presentada en la superficie de la levadura. Brevemente, las células cultivadas en condiciones inductoras se incubaron con monómero FcγR11IA-enlazador-avitag biotinilado 0,1 μM durante 1 hora. Las células se lavaron para eliminar el ligando marcado. Después, las células marcadas se incubaron durante diferentes períodos de tiempo con monómero FcγR11IA-enlazador-avitag no marcado 0,1 μM, se lavaron y luego se tiñeron con SA:PE para el análisis de FACS (Figura 20). Las células también se tiñeron con Fc antihumano de cabra para mostrar que la presentación de Fc se mantuvo durante el experimento.

Con base en el estudio de competición, se determinó que una incubación de 1 minuto daba como resultado una pérdida de aproximadamente el 50% de la tinción celular. Este punto de tiempo se eligió para el cribado cinético utilizando la biblioteca P396L. Se incubó aproximadamente un exceso de 10 veces de la biblioteca (10^8 células) con monómero FcγR11IA-enlazador-avitag biotinilado 0,1 μM en un volumen de 0,5 ml. Las células se lavaron y luego se incubaron durante 1 minuto con ligando sin marcar. Posteriormente, las células se lavaron y marcaron con SA:PE. La mezcla se clasificó mediante FACS, seleccionando el 0,3% superior de aglutinantes. Se cultivaron células de levadura seleccionadas en medio selectivo que contenía glucosa y se reindujeron en medio selectivo que contenía galactosa. El cribado cinético se repitió por segunda vez y el cuadrante de clasificación se estableció para recoger el 0,2% superior de aglutinantes. La biblioteca de P396L no seleccionada se comparó con las células de levadura seleccionadas para mejorar la unión por FACS (Figura 21). Los histogramas muestran el porcentaje de células que se combinan tanto con FcγR11IA/PE como con Fc/FITC antihumano de cabra (arriba a la derecha).

Las células de levadura seleccionadas del segundo tipo se cultivaron luego en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó luego para recolectar ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de 4-4-20 usando los métodos descritos anteriormente. Se seleccionaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ELISA y ADCC de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Mutantes seleccionados por FACS usando un cribado cinético utilizando cantidades equimolares de CD16A sin marcar durante 1 minuto.

Mutantes	Cambios de aminoácido
MgFc50	P247S, P396L
MgFc51	Q419H, P396L
MgFc52	V240A, P396L
MgFc53	L410H, P396L
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
MgFc55	R255I, P396L
MgFc57	L242F, P396L
MgFc59	K370E, P396L

Cribados 4 y 5: Combinación de la etapa de agotamiento de FcγRIIB en fase sólida con la selección de FcγR11IA por clasificación de FACS, utilizando el alelo FcγR11IA 158V

El análisis de las variantes de Fc del cribado 1 mostró que las mutaciones que se seleccionaron del cribado secundario habían mejorado la unión a FcγR11IA y FcγRIIB. Por lo tanto, los datos sugirieron que el agotamiento secuencial y la selección usando perlas magnéticas (fase sólida) en las condiciones establecidas no seleccionaron eficientemente la unión diferencial de FcγR11IA y FcγRIIB. Por lo tanto, con el fin de cribar más eficazmente los mutantes que se unen a FcγR11IA, mientras que tienen unión reducida o nula a FcγRIIB, la etapa de agotamiento de FcγRIIB en fase sólida se

combinó con la selección de FcγRIIIA por clasificación de FACS. Esta combinación identificó variantes de Fc que se unen a FcγRIIIA con mayor o igual afinidad que la Fc de tipo silvestre.

Se incubó un exceso de 10 veces de la biblioteca sin tratamiento previo (~10⁷) con perlas magnéticas recubiertas con FcγRIIB. La levadura unida a perlas se separó de la fracción no unida colocando el tubo que contenía la mezcla en un campo magnético. Aquellas células de levadura que no estaban unidas a las perlas se retiraron y se colocaron en medio fresco y posteriormente se reindujeron en medio que contenía galactosa. El agotamiento de FcγRIIB mediante perlas magnéticas se repitió 5 veces. Se analizó la población de levadura resultante y se encontró que mostraba más del 50% de tinción celular con Fc antihumano de cabra y un porcentaje muy pequeño de células se tiñeron con FcγRIIIA. A continuación, estas células se seleccionaron dos veces mediante un tipo de FACS usando FcγRIIIA-enlazador-Avitag biotinilado 0,1 μM (datos no mostrados). El FcγRIIIA fue el alotipo 158V. Las células de levadura se analizaron para determinar la unión de FcγRIIIA y FcγRIIB después de cada clasificación y se compararon con la unión por el dominio Fc de tipo silvestre (Figura 22).

Las células de levadura seleccionadas del segundo tipo se cultivaron luego en condiciones selectivas en glucosa. Este cultivo se usó luego para recolectar ADN. Los insertos que contienen el dominio Fc se amplificaron mediante PCR y se clonaron en la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de 4-4-20. Se cribaron aproximadamente 90 mutantes de Fc mediante ELISA y ADCC de 4-4-20 y los mutantes positivos resultantes se muestran en la Tabla 18 (mutantes 61-66).

Tabla 18: Mutantes seleccionados por agotamiento de perlas magnéticas usando perlas recubiertas con CD32B y selección final por FACS usando FcγRIIIA 158Valina o 158Fenilalanina

Mutantes	Cambios de aminoácido
MgFc61	A330V
MgFc62	R292G
MgFc63	S298N, K360R, N361D
MgFc64	E233G
MgFc65	N276Y
MgFc66	A330V, V427M
MgFc67	V284M, S298N, R355W, R416T

Cribado de mutantes de Fc usando el alelo 158F de FcγRIIIA: existen dos alelos diferentes del receptor FcγRIIIA que tienen diferentes afinidades de unión para el dominio Fc de IgG1 (Koene et al., 1997, Blood 90: 1109-1114; Wu et al., 1997, J. Clin. Invest. 100: 1059 - 70). El alelo 158F se une al dominio Fc con una constante de unión de 5 a 10 veces menor que el alelo 158V. Previamente, todos los cribados de Fc que usaban presentación en levadura se realizaron usando el alelo 158V de alta unión como ligando. En este experimento, se seleccionaron mutantes de Fc de la población de levadura empobrecida en FcγRIIB usando monómero avitag-enlazador FcγRIIIA158F biotinilado como ligando. El cuadrante de clasificación se estableció para seleccionar los aglutinantes 158F de FcγRIIIA del 0,25 por ciento superior. La población enriquecida resultante se analizó mediante FACS (Figura 23A). A continuación, se aislaron los clones individuales y se analizó su unión a diferentes FcγR mediante FACS (Figura 23B). El análisis de clones individuales de la población resultó en la identificación de un solo mutante que albergaba 5 mutaciones de MgFc67 (V284M, S298N, K334E, R355W, R416S), que tenían una unión mejorada a FcγRIIIA y una unión reducida a FcγRIIB.

Cribado secundario de mutantes mediante un ensayo de ADCC para los cribados 1, 2 y 3:

Los mutantes que se seleccionaron en los cribados anteriores se analizaron luego usando un ensayo de ADCC estándar para determinar las velocidades relativas de lisis mediada por ch4-4-20 que alberga los mutantes de Fc. Los anticuerpos ch4-4-20 que portan las variantes de Fc se construyeron usando métodos ya descritos anteriormente. Se usaron células SK-BR3 como dianas y las células efectoras fueron PBMC que se aislaron de donantes usando un gradiente de Ficoll, como se describió anteriormente (Sección 6.7). Los resultados de la actividad de ADCC para los mutantes se resumen en la Tabla 19.

Como se observa en la Tabla 19, los mutantes aislados usando los cribados primarios y secundarios anteriores basados en el agotamiento de FcγRIIB y la selección de FcγRIIIA mostraron una actividad de ADCC mejorada en relación con el tipo silvestre.

Tabla 19: Análisis de ADCC mediado por anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 en células SKBR3 recubiertas con fluoresceína.

Mutante	Cambio de aminoácido	Tasa relativa de lisis
MgFc37	K248M	3,83
MgFc38	K392T, P396L	3,07
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	4,29
MgFc41	H268N, P396LN	2,24
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1,09

MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	3,17
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	3,3
MgFc44	K334N, P396L	2,43
MgFc46	P217S, P396L	2,04
MgFc47	K210M, P396L	2,02
MgFc48	V379M, P396L	2,01
MgFc49	K261N, K210M, P396L	2,06
MgFc50	P247S, P396L	2,1
MgFc51	Q419H, P396L	2,24
MgFc52	V240A, P396L	2,35
MgFc53	L410H, P396L	2
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L	3,59
MgFc55	R2551, P396L	2,79
MgFc57	L242F, P396L	2,4
MgFc59	K370E, P396L	2,47
MgFc60	P217S, P396L	1,44

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

5 Los mutantes se clonaron adicionalmente en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal antitumoral 4D5 (anti-HER2/neu) y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 2H7 reemplazando el dominio Fc de estos anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron y purificaron y probaron en un ensayo de ADCC usando métodos estándar por transfección transitoria en células 293H y purificación sobre columna de proteína G. Los anticuerpos quiméricos 4D5 se probaron en un ensayo de ADCC usando células SK-BR3 como dianas (Figura 24), mientras que los anticuerpos quiméricos 2H7 se probaron en un ensayo de ADCC usando células Daudi como dianas (Figura 25).

15 Cribado secundario de mutantes mediante BIAcore: A continuación, los mutantes que se seleccionaron en los cribados anteriores se analizaron mediante BIAcore para determinar los parámetros cinéticos para la unión de FcγRIIIA (158V) y FcγRIIB. El método utilizado fue similar al descrito en la Sección 6.8, más arriba.

20 Los datos mostrados son valores de $K_{\text{disociación}}$ relativos a las tasas de disociación de tipo silvestre determinadas a partir de experimentos que utilizan los mutaciones de Fc en el anticuerpo monoclonal ch4-4-20. Los números relativos superiores a uno indican una disminución en la tasa de $K_{\text{disociación}}$. Los números inferiores a uno indican un aumento en la tasa de disociación.

25 Los mutantes que mostraron una disminución en las tasas de disociación de FcγRIIIA fueron MgFc38 (K392, P396L), MgFc43 (Y319F, P352L, P396L), MgFc42 (D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D), MgFc44 (K334N, P396L), MgFc46 (P217S, P396L), MgFc49 (K261N, K210M, P396L). Los mutantes que mostraron una disminución en la tasa de disociación para FcγRIIB fueron, MgFc38 (K392, P396L), MgFc39 (E293V, Q295E, A327T), MgFc43 (K288R, T307A, K344E, P396L), MgFc44 (K334N, P396L). Los datos de BIAcore se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20: Datos de BIAcore.

Mutante de Fc	Residuos de AA	FcγRIIIA158V ($K_{\text{disociación}}$ WT/Mut)	FcγRIIB ($K_{\text{disociación}}$ WT/Mut)
MgFc37	K248M	0,977	1,03
MgFc38	K392T, P396L	1,64	2,3
MgFc39	E293V, Q295E, A327T	0,86	1,3
MgFc41	H268N, P396LN	0,92	1,04
MgFc43	Y319F, P352L, P396L	1,23	2,29
MgFc42	D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D	1,38	
MgFc43b	K288R, T307A, K344E, P396L	1,27	0,89
MgFc44	K334N, P396L	1,27	1,33
MgFc46	P217S, P396L	1,17	0,95
MgFc47	K210M, P396L		
MgFc48	V379M, P396L		
Mutante de Fc	Residuos de AA	FcγRIIIA158V ($K_{\text{disociación}}$ WT/Mut)	FcγRIIB ($K_{\text{disociación}}$ WT/Mut)
MgFc49	K261N, K210M, P396L	1,29	0,85
MgFc50	P247S, P396L		

MgFc51	Q419H, P396L		
MgFc52	V240A, P396L		
MgFc53	L410H, P396L		
MgFc54	F243L, V305I, A378D, F404S, P396L		
MgFc55	R255I, P396L		
MgFc57	L242F, P396L		
MgFc59	K370E, P396L		
MgFc60	P217S, P396L		
MgFc61	A330V	1	0,61
MgFc62	R292G	1	0,67
MgFc63	S298N, K360R, N361D	1	0,67
MgFc64	E233G	1	0,54
MgFc65	N276Y	1	0,64
MgFc66	A330V, G427M,	1	0,62
MgFc67	V284M, S298N, K334E, R355W, R416T		

La invención descrita y reivindicada en el presente documento no debe limitarse en alcance a las realizaciones específicas descritas en el presente documento, ya que estas realizaciones pretenden ser una ilustración de varios aspectos de la invención. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

5

Listado de Secuencias

<110> MacroGenics, Inc.

10 <120> IDENTIFICACIÓN Y MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CON REGIONES Fc VARIANTES Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

<130> 11183-004-228

15 <140> para ser asignado
<141>

<150> 60/439.498

<151> 2003-01-09

20

<150> 60/456.041

<151> 2003-03-19

25

<150> 60/514.549

<151> 2003-10-23

<160> 10

30

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 86

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador: 5' enlazador.avitag

40

400> 1

```

ggccgcaggt ggtgggtggtt ctgggtgggtgg tggttctggt ctgaacgaca tcttcgaggc 60
tcagaaaatc gaatggcacg aatgat                                     86
    
```

<210> 2

<211> 86

ES 2 897 506 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador: 3' enlazador.avitag

 <400> 2

 ctagatcatt cgtgccattc gattttctga gcctcgaaga tgtcgttcag accagaacca 60
 ccaccaccag aaccaccacc acctgc 86

 10 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador: FcR3A izquierdo

 <400> 3
 20 gttggatcct ccaactgctc tgctactct agtt 35

 <210> 4
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador: FcR3A derecho

 30 <400> 4
 gaaaagctta aagaatgatg agatggttga cact 34

 <210> 5
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador: FcR2B derecho

 40 <400> 5
 gaagtcgaca atgatcccca ttggtgaaga g 31

 <210> 6
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Cebador: FcR2B izquierdo

 <400> 6
 gttagatctt gctgtgctat tctggctcc 30

 55 <210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador: IgG1 derecho

 <400> 7
 atagtcgacc actgatttac ccggaga 27

 65 <210> 8

ES 2 897 506 T3

<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador: IgG1 izquierdo

<400> 8
ggaattcaac accaaggtgg acaagaaagt t 31

10 <210> 9
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador: mcr025;chl(f)

<400> 9
20 aaagatccg cgagctcagc ctccaccaag g 31

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador: H021

30 <400> 10
gtctgctcga agcattaacc 20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende una región Fc variante de IgG1 humana, en el que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, de manera que dicho anticuerpo se une específicamente a FcγRIIIA con una mayor afinidad que un anticuerpo comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre; y en el que dicha al menos una modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 396 con leucina, en el que dicha numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región Fc variante se diferencia de dicha región Fc de tipo silvestre en que comprende una modificación o modificaciones de aminoácidos adicionales de: 242F; 244H; 268D; 268N; 3261; 334N; 370E; 384K; 392T; 419H; o 419L.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región Fc variante se diferencia de dicha región Fc de tipo silvestre en que comprende una modificación o modificaciones de aminoácidos adicionales seleccionadas del grupo que consiste en:
- (1) 221E; 270E; 308A, 311H y 402D;
- (2) 288R; 307A; y 344E; y
- (3) 210M y 261N.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región Fc variante de dicho anticuerpo también se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad alterada con respecto a dicho anticuerpo comparable que comprende dicha región Fc de tipo silvestre.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo media una citotoxicidad mejorada mediada por células dependientes de anticuerpo al menos 2 veces más eficazmente con respecto a dicho anticuerpo comparable que comprende dicha región Fc de tipo silvestre.
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable que se une a FcγRIIB.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho anticuerpo comprende adicionalmente una región de unión a antígeno que es capaz de unirse específicamente a un antígeno del cáncer.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que dicho antígeno del cáncer es $\alpha 4\beta 7$, integrina $\alpha V\beta 3$, integrina $\beta_2, 4.2, 17\text{-IA}, 19.9, \text{AH}6, \text{ALe}^b$, receptor anti-glicoproteína IIB/IIIa, antígeno 38.13 del linfoma de Burkitt, antígeno carcinoembrionario, C14, CA125, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40L, CD52, CD64, CD80, CD-147, CEA, CO17-1A, Factor 5 del complemento, CTA-1, D1.1, D156-22, E₁, EGFR, F3, G49, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3, mucinas de cáncer gástrico, G_{D2}, G_{D3}, GICA 19-9, HER2/neu, antígeno de melanoma de alto peso molecular, gp120 de VIH, HLA, antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, ICAM3, antígeno de pancarcinoma KS 1/4, L20, LEA, Le^a, Le^b, Le^c, M18, M39, antígeno APO-1 de linfocito humano maligno, antígeno de melanoma gp75, antígeno asociado a melanoma p97, MH2, Myl, NS-10, OFA-1, OFA-2, antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno prostático específico, antígeno prostático específico de membrana, fosfato ácido prostático, R₂₄, SSEA-1, antígeno Gp37 de células T, T₅A₇, TAG-72, TNF- α , TGF- β_2 , TRA-1-85, tipo de trasplante específico de tumor de antígeno de superficie celular, VEGF, VEP8, VEP9, VIM-D5, VLA-4, o hapteno Y.
11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para uso en el tratamiento, en un sujeto, de un cáncer caracterizado por dicho antígeno del cáncer.
12. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 11 para dicho tratamiento del cáncer, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, de ovario, de próstata, de cuello uterino, o pancreático.
13. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 para dicho tratamiento del cáncer que comprende además la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer.
14. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 13 para dicho tratamiento de cáncer, en el que dicha terapia adicional de cáncer se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, terapia hormonal, y cirugía.

15. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para dicho tratamiento del cáncer, en el que dicho sujeto es un ser humano.

16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, que comprende además uno o más agentes anticancerígenos adicionales.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que dicho uno o más agentes anticancerígenos es un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, un agente terapéutico hormonal, o un agente inmunoterapéutico.

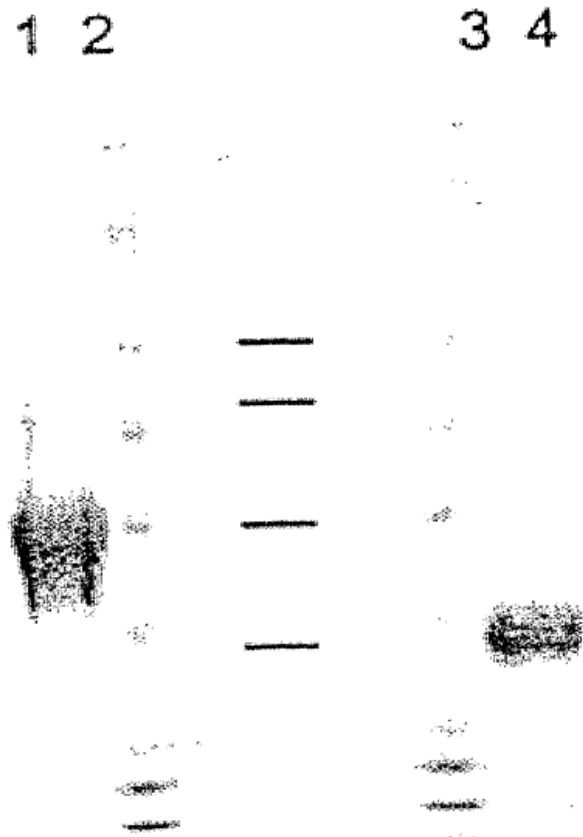


FIG. 1

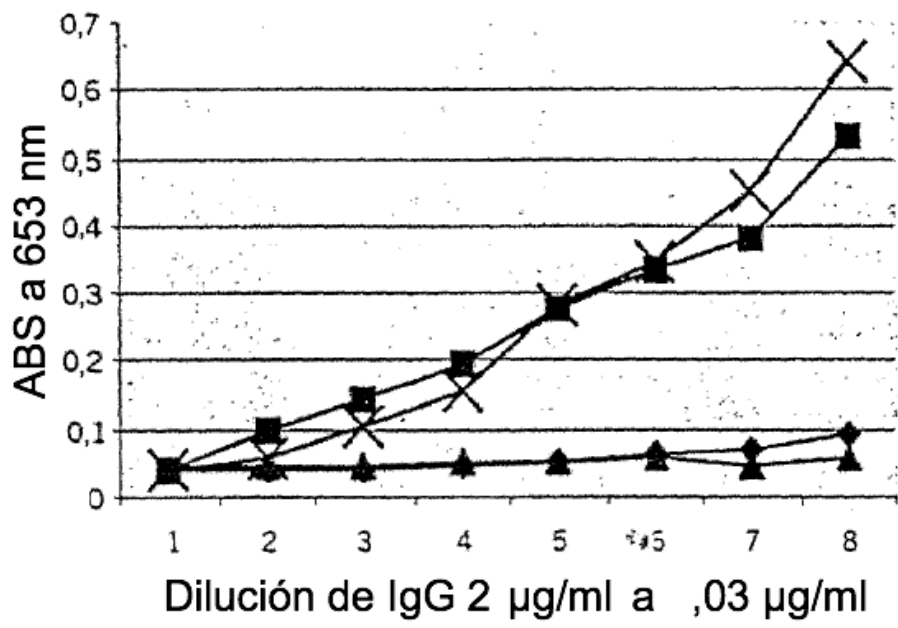


FIG. 2

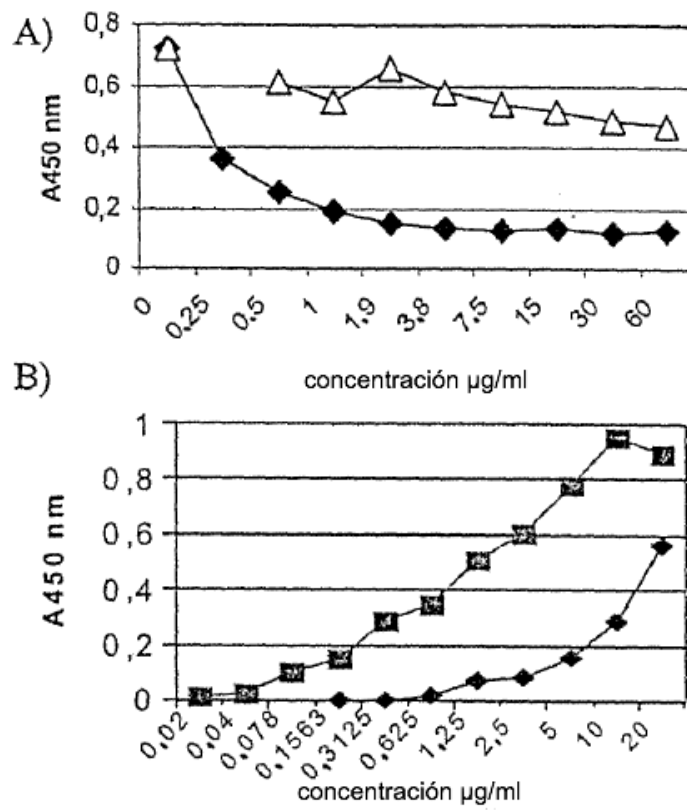


FIG. 3

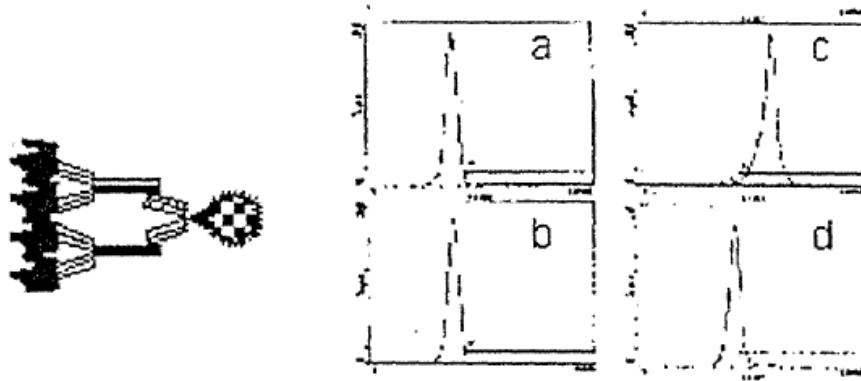


FIG. 4

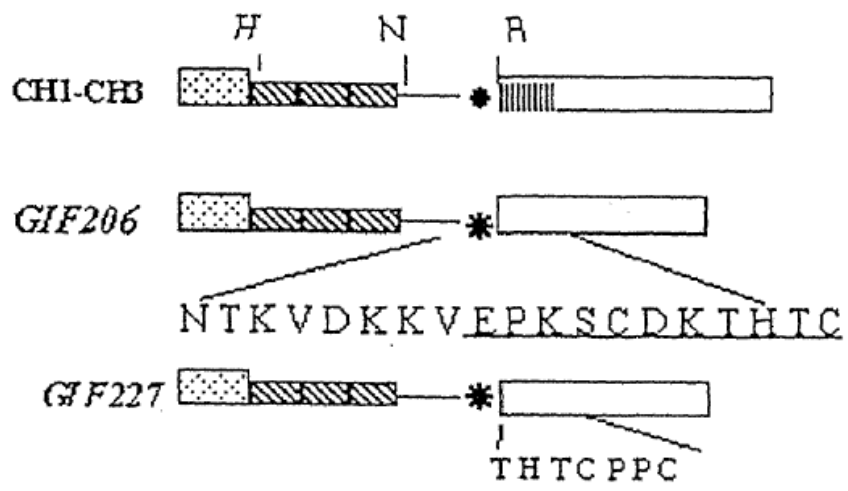


FIG. 5

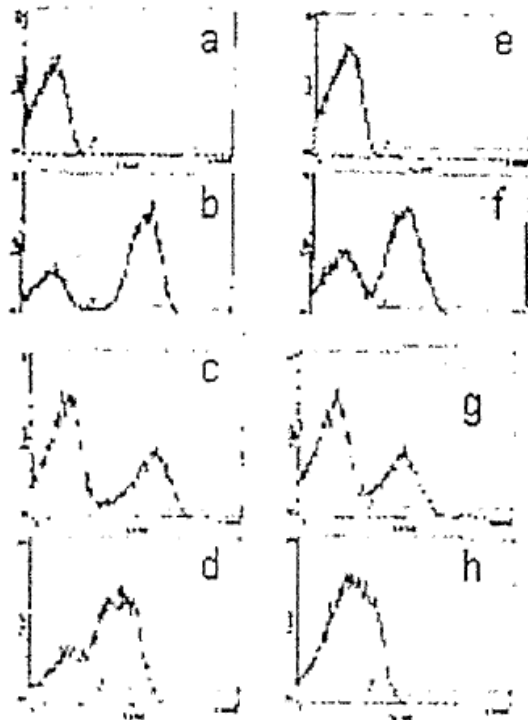


FIG. 6

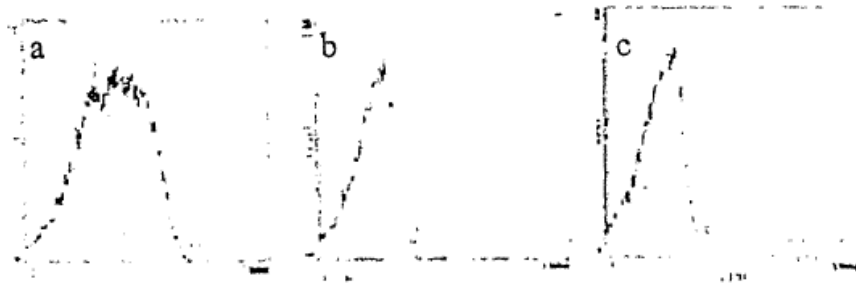


FIG. 7

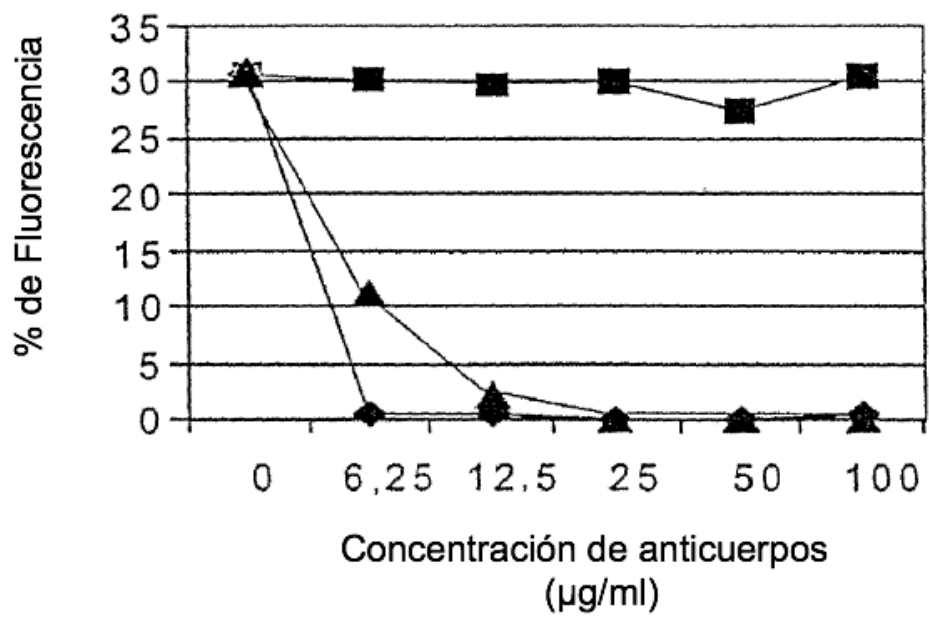


FIG. 8

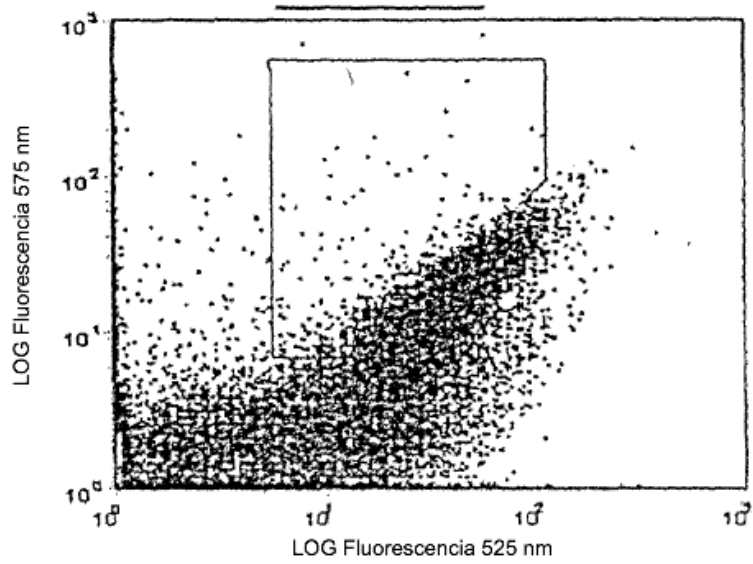


FIG. 9

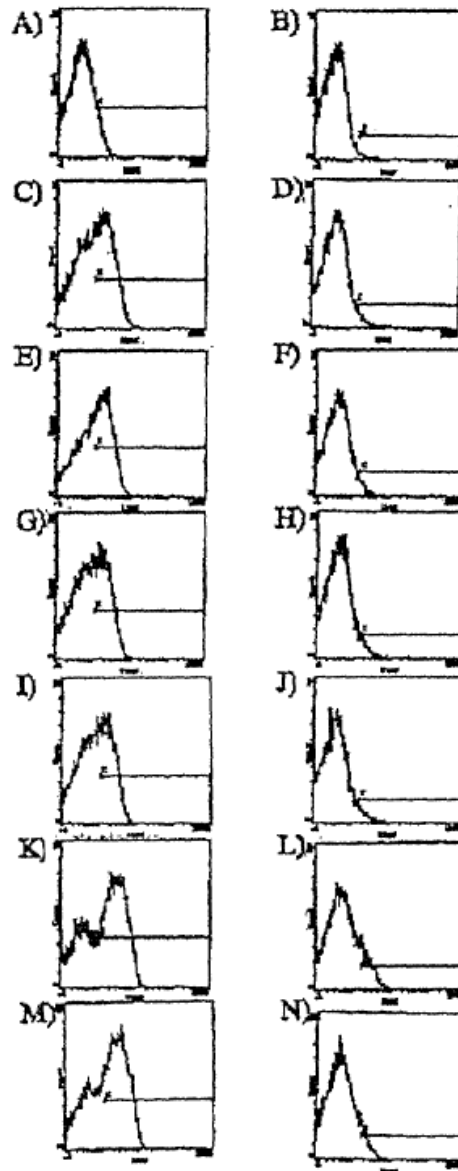


FIG. 10

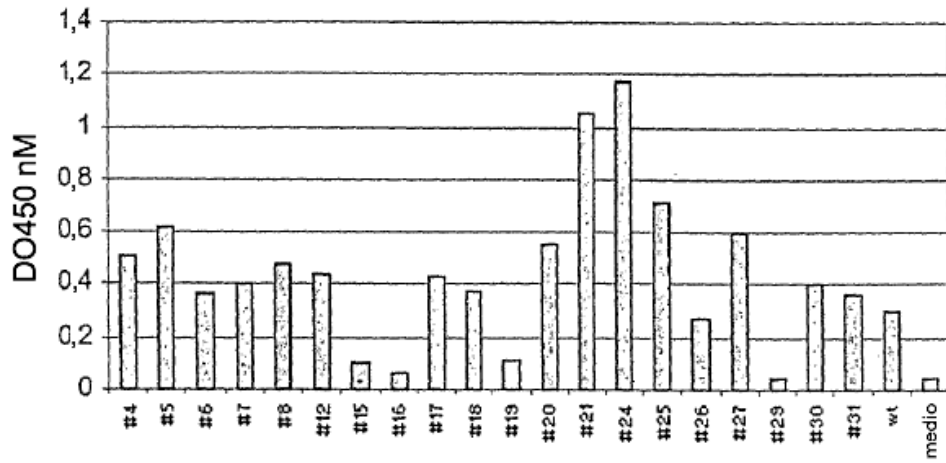


FIG. 11

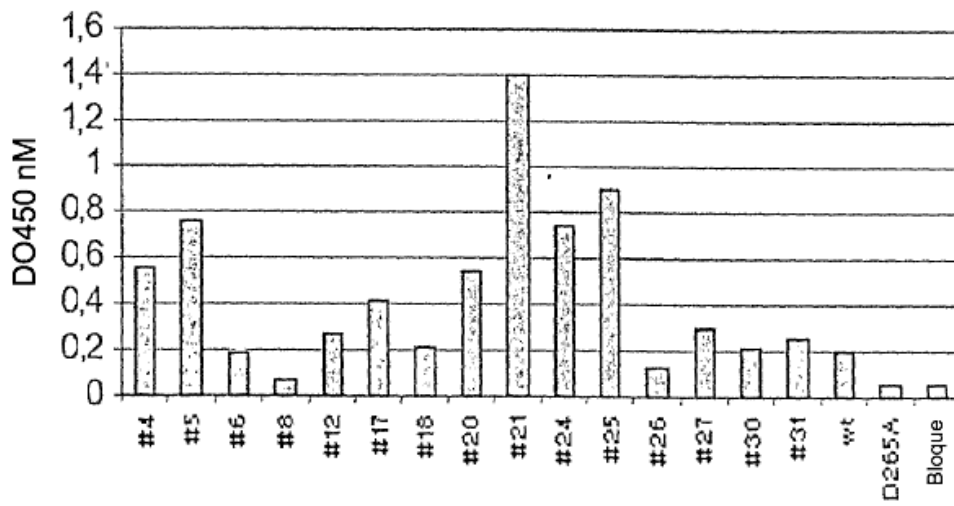


FIG. 12

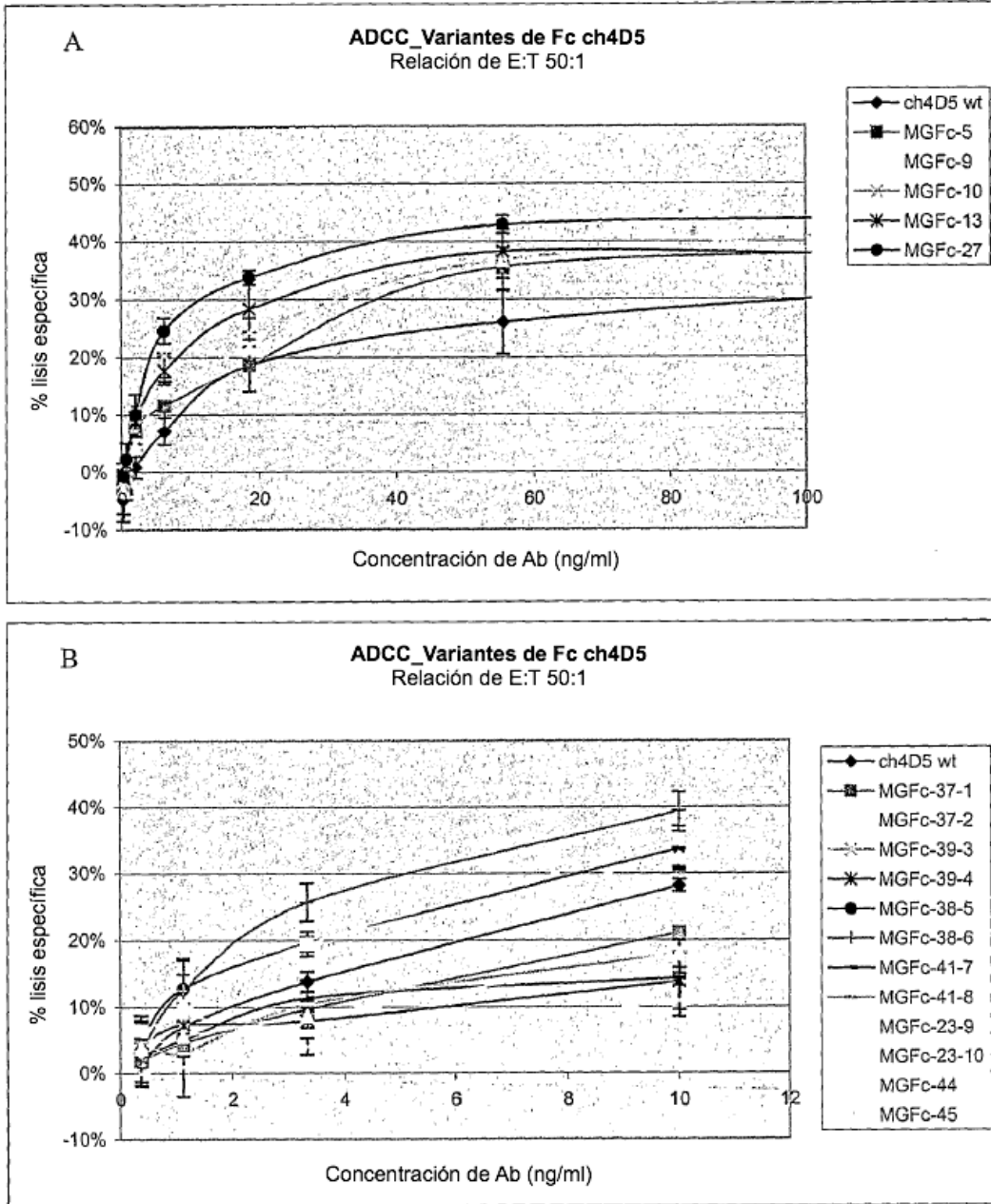


FIG. 13

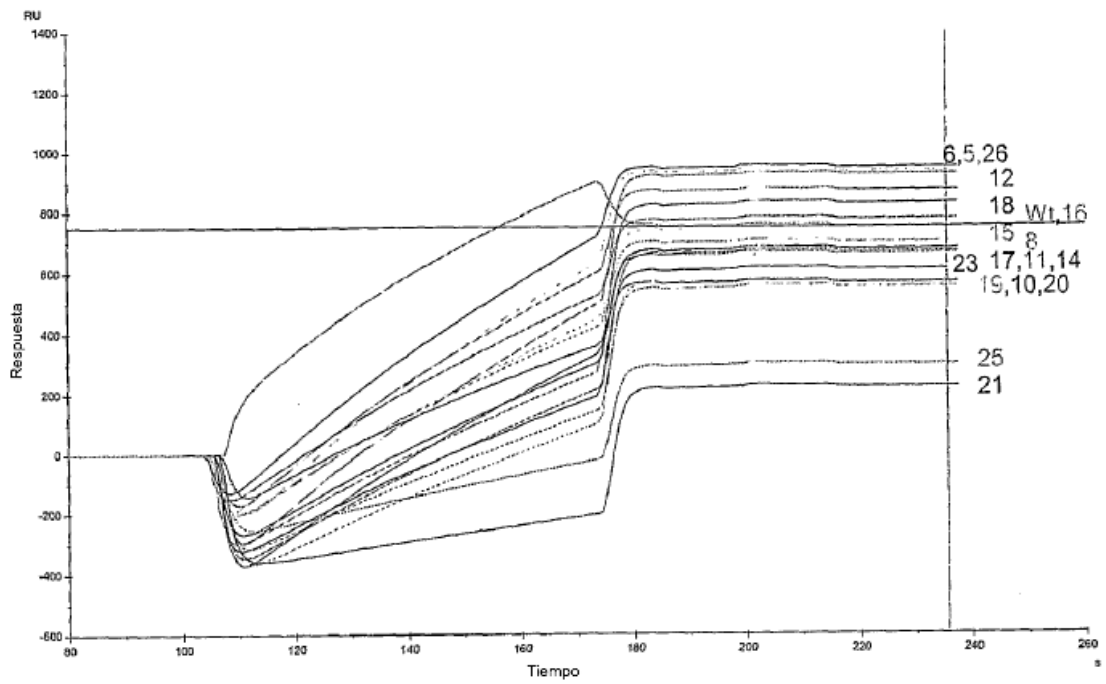


FIG. 14

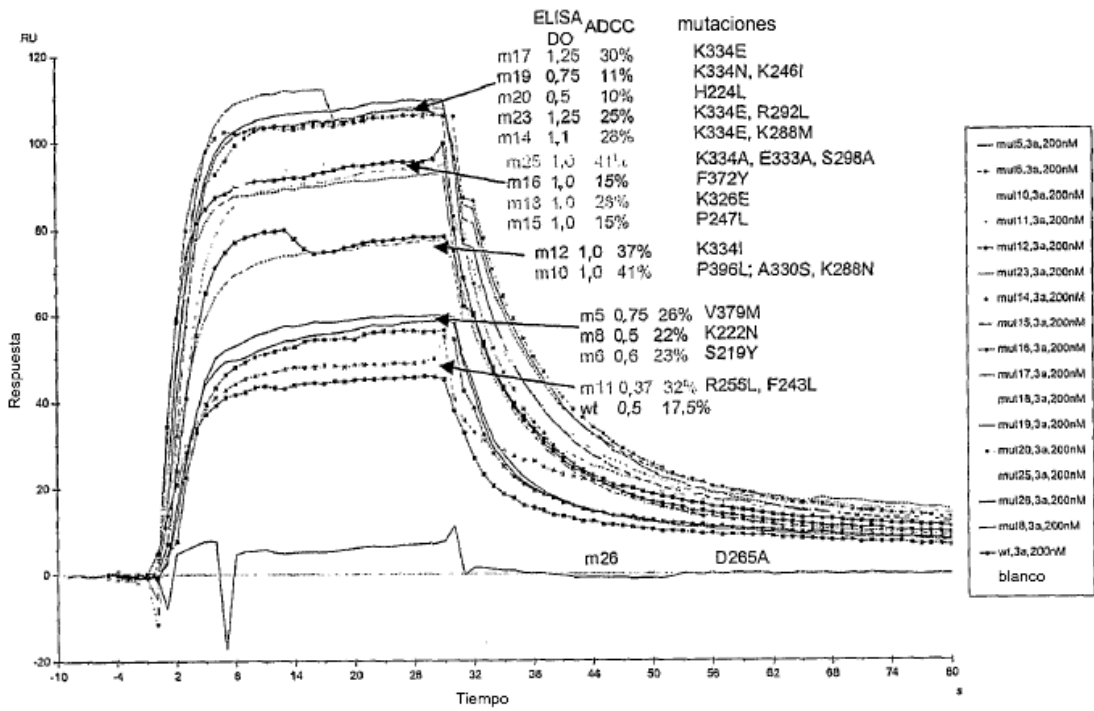


FIG. 15

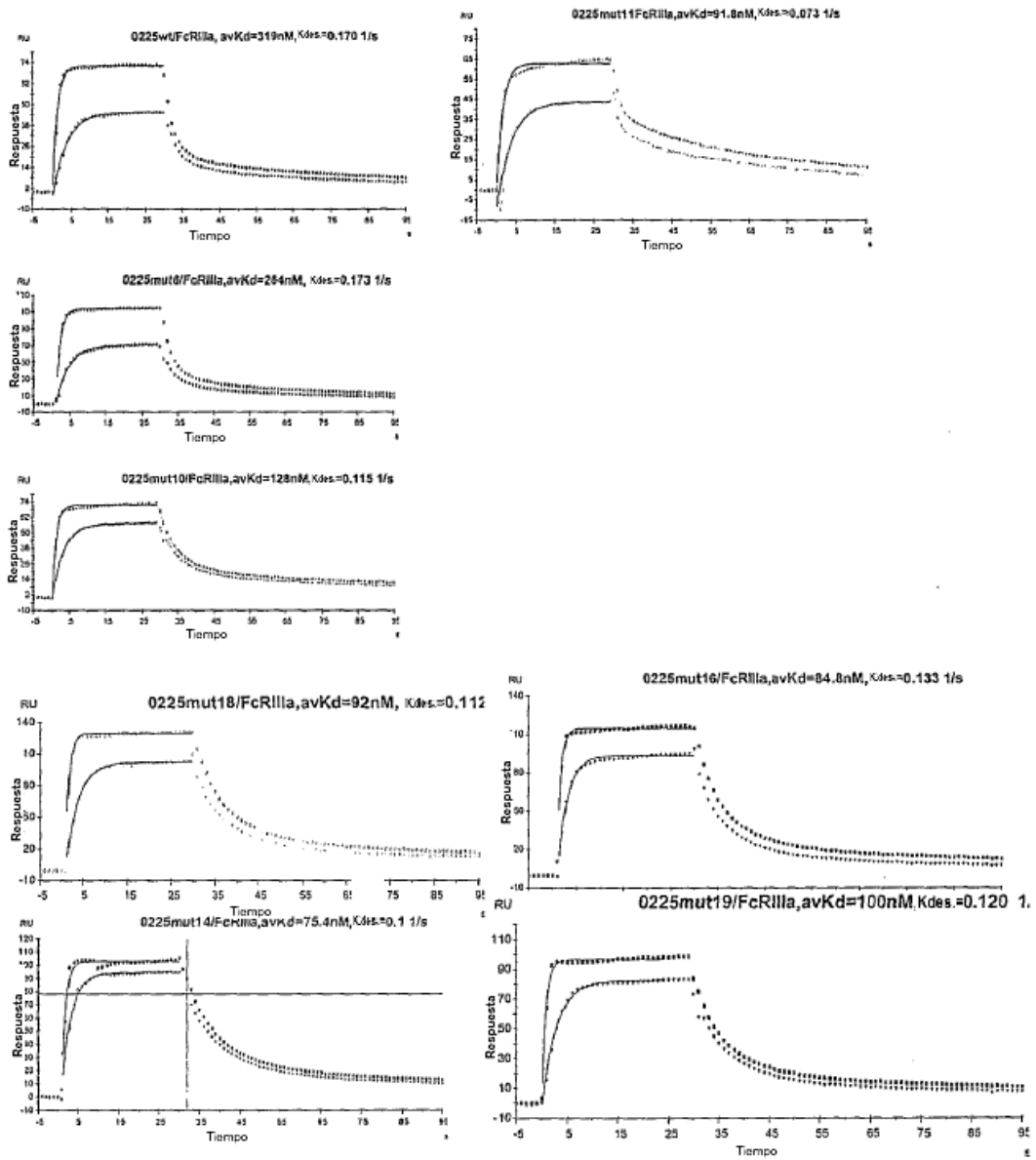


FIG. 16

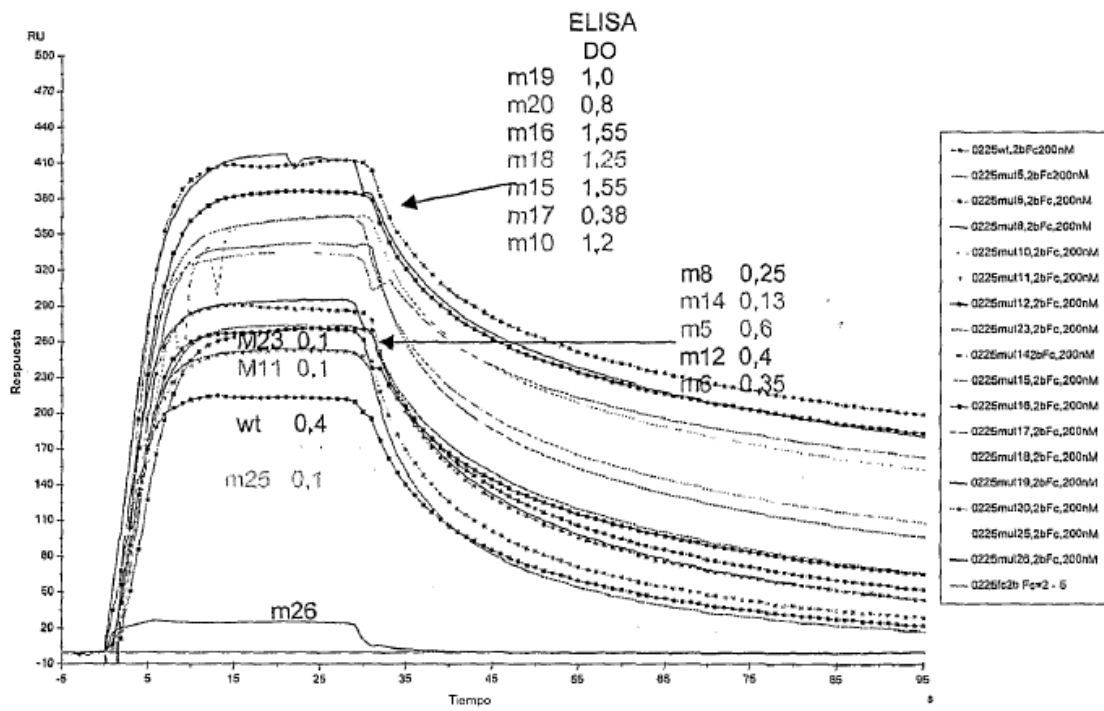


FIG. 17

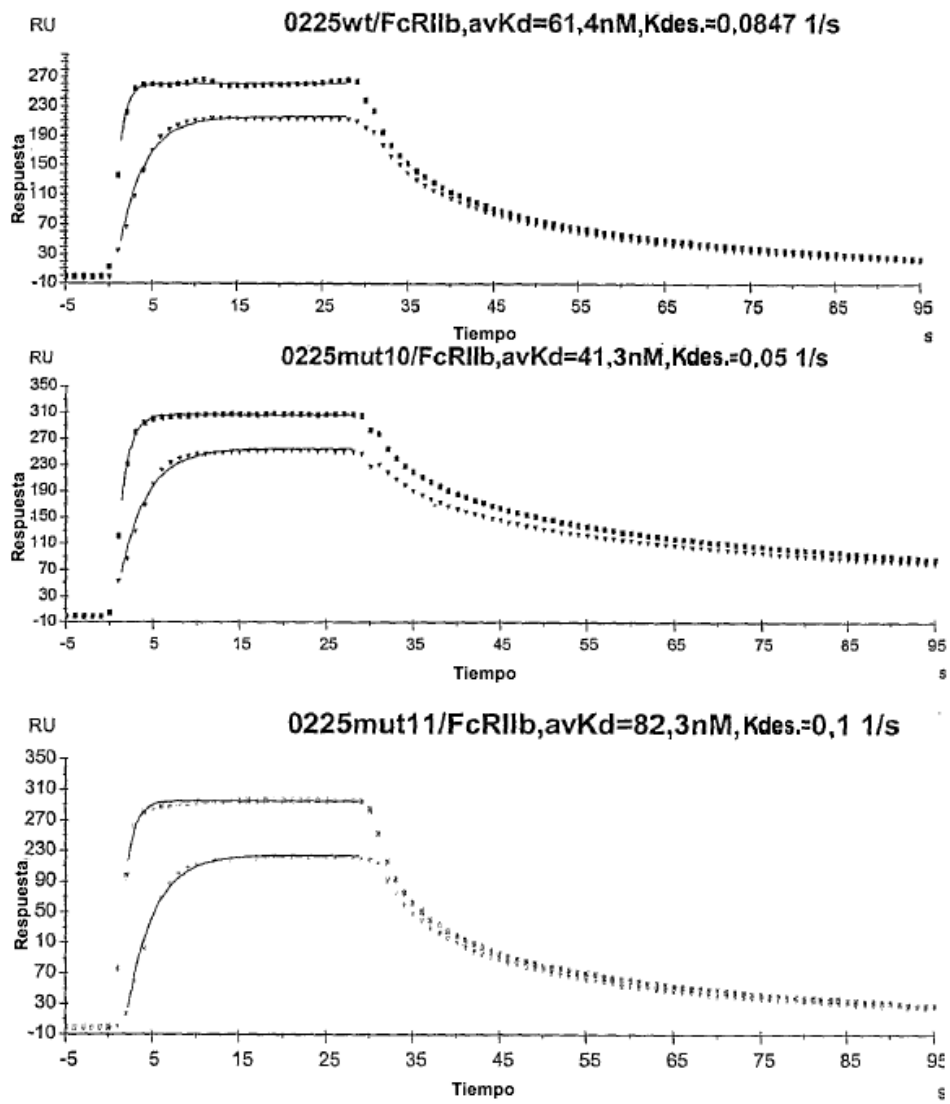


FIG. 18

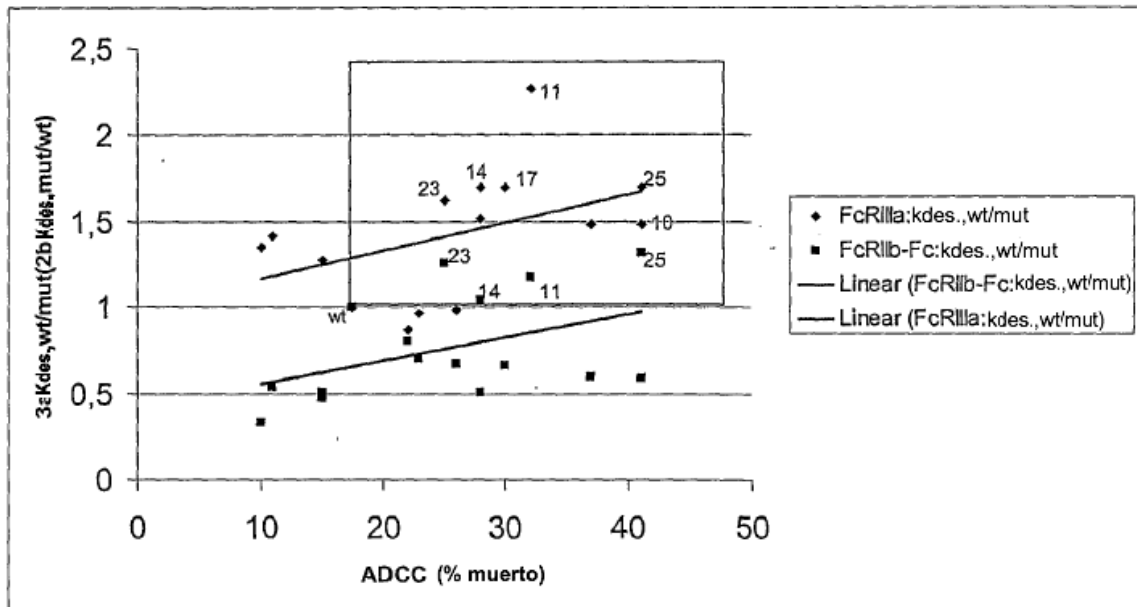


FIG. 19

Análisis de FACS de competición de FcR3A

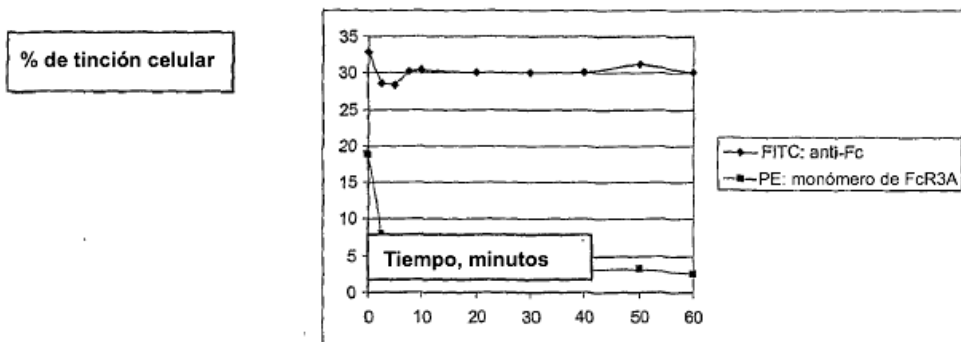


FIG. 20



FIG. 21

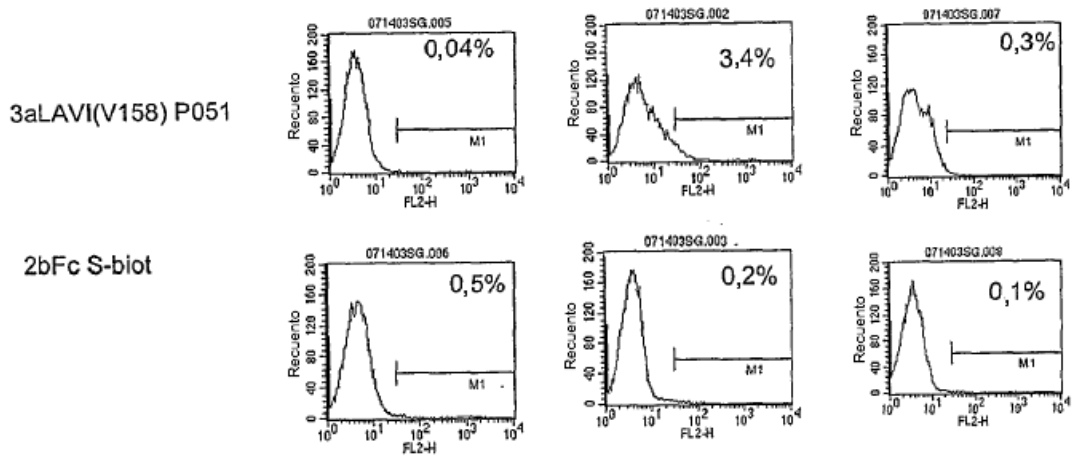


FIG. 22

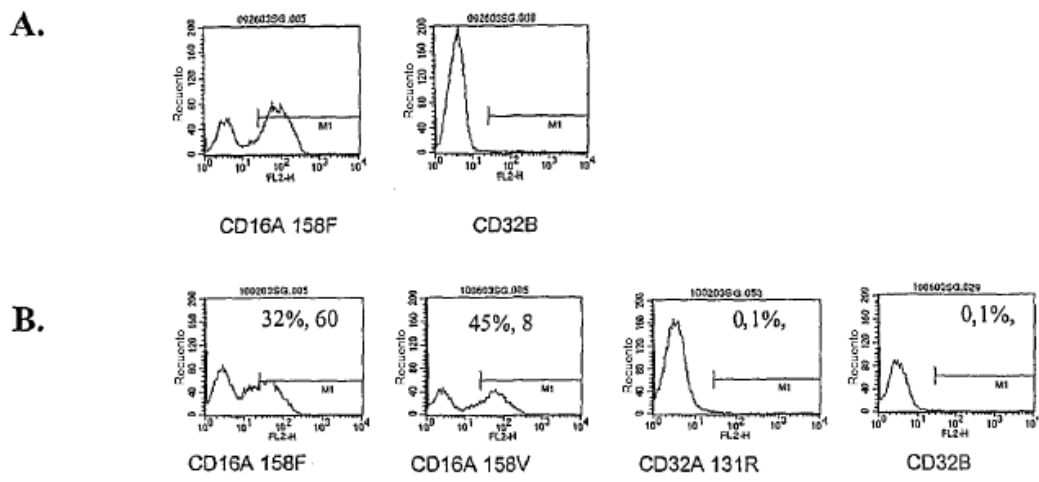


FIG. 23

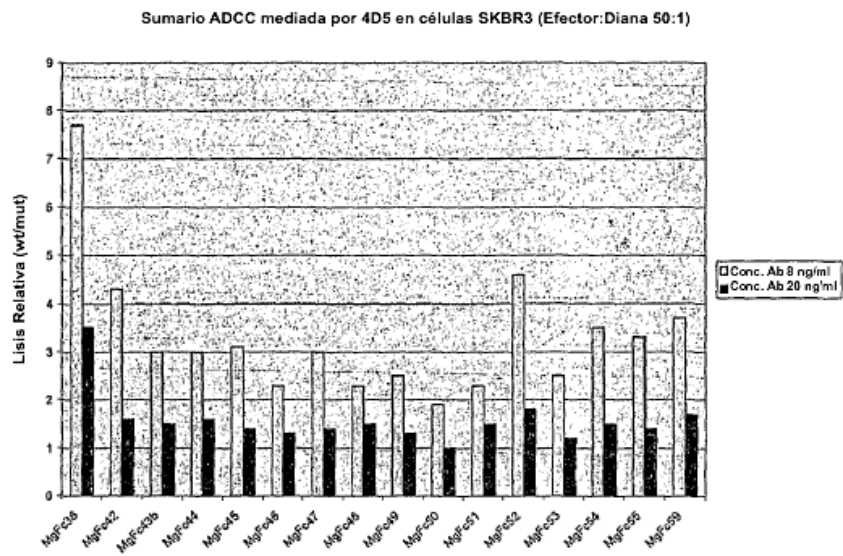


FIG. 24

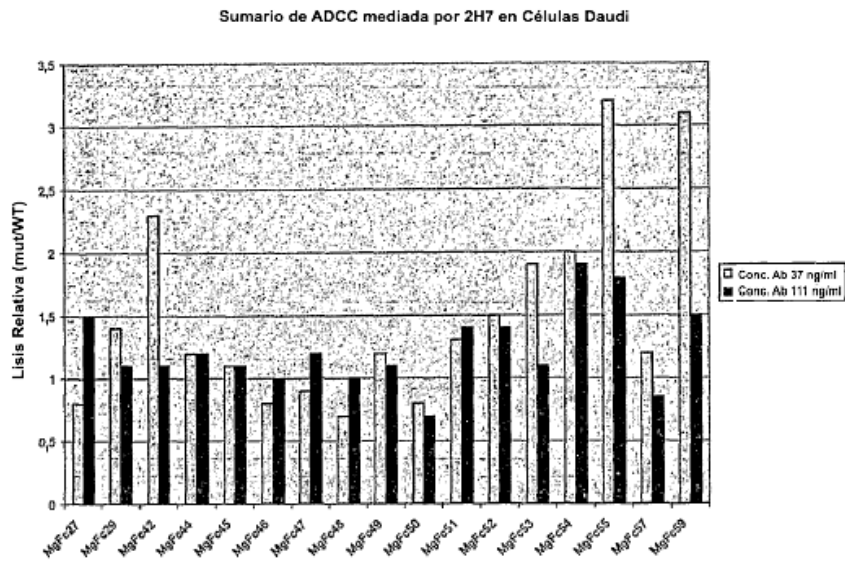


FIG. 25