

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 666**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2006 E 06784551 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1896503**

54 Título: **Anticuerpos IgG1 con la parte Fc mutada para el aumento de unión al receptor FcRn y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**31.05.2005 US 685934 P**

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

**28.11.2014**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 W. 7TH ST.  
AUSTIN TX 78748, US**

72 Inventor/es:

**WARD, E. SALLY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 523 666 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

Anticuerpos IgG1 con la parte Fc mutada para el aumento de unión al receptor FcRn y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a los campos de la inmunología y la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de Ig modificadas con características mejoradas.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

15 La inmunoglobulina G (IgG) constituye la clase de inmunoglobulina más prevalente en el suero del ser humano y de otros mamíferos. A pesar de las fluctuaciones en sus tasas de síntesis en los linfocitos B, las IgG se mantienen a niveles netamente constantes en el suero. Si se altera la homeostasis de la IgG, se puede producir entonces una patología debido a niveles demasiado altos (hipergamaglobulinemia) o demasiado bajos (hipogamaglobulinemia). Los estudios indican que el receptor relacionado con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, FcRn, está implicado en la homeostasis de las IgG del suero (Ghetie y col, 1996; Junghans y Anderson, 1996; Israel y col, 20 1996). Este receptor actúa muy probablemente como receptor de recuperación, y sería coherente con su conocida capacidad para la transcitosis de IgG en forma intacta a través del intestino neonatal (Wallace y Rees, 1980; Rodewald y Kraehenbuhl, 1984) y saco vitelino (Roberts y col, 1990; Israel y col, 1995) o placenta (Kristoffersen y Matre, 1996; Simister y col, 1996; Leach y col, 1996; Firan y col, 2001). Estudios más recientes indican que el FcRn también está implicado en el transporte de IgG a través de las barreras celulares epiteliales y endoteliales de origen diverso (Antohe y col, 2001; McCarthy y col., 2000; Spiekermann y col, 2002; Dickinson y col, 1999; Kobayashi y col, 25 2002; Yoshida y col, 2004), y esto tiene relevancia en el suministro de IgG a diferentes sitios del cuerpo. Por lo tanto, el uso de modificación proteica para modificar el sitio de interacción de una IgG con el FcRn ofrece una forma para modular la persistencia, distribución y transporte de ese anticuerpo en el suero.

30 Se han mapeado los sitios de interacción del FcRn en la IgG1 de ratón (mIgG1) y la IgG1 humana (hIgG1) utilizando mutagénesis dirigida al sitio de fragmentos Fc bisagra recombinantes, seguida por análisis de estos fragmentos tanto *in vitro* como *in vivo* (Kim y col, 1994b; Medesan y col, 1996; Medesan y col, 1997; Kim y col, 1999). A partir de estos estudios, la I253 (numeración EU (Edehnan y col, 1969)), H310, H435 y en menor grado, H436 (Y436 en hIgG1) tienen un papel crucial en esta interacción. Estos aminoácidos se localizan en la interfase del dominio CH2-CH3 (Deisenhofer, 1981), y el mapeo del sitio funcional de estos restos es coherente con la estructura cristalográfica del FcRn de rata que forma un complejo con Fc de rata (Burmeister y col, 1994b; Martin y col, 2001).

40 El sitio de interacción engloba tres bucles cerrados espacialmente compuestos por secuencias que están distales en la secuencia de aminoácidos primaria. El papel central de las histidinas Fc en la construcción de este sitio influye en la marcada dependencia del pH (unión a pH 6,0, liberación a pH 7,2-7,4) de la interacción Fc-FcRn (Rodewald y Kraehenbuhl, 1984; Raghavan y col, 1995; Popov y col, 1996), de forma que la pKa de uno de los protones de imidazol reposa en este intervalo de pH. Esta dependencia del pH es esencial para la liberación de las moléculas de IgG unidas al FcRn cuando llegan a la superficie celular tras el reciclado o transcitosis celular (Ghetie y Ward, 2000; Ober y col, 2004a). Las I253, H310, H435 y en menor grado, H436, están altamente conservadas en las IgG 45 humanas e IgG de roedores (Kabat y col, 1991). Esto, junto con el aislamiento de un homólogo humano de FcRn (Story y col, 1994), indican que los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis y el transporte de la IgG son comunes tanto en ratón como en el hombre y tienen sus implicaciones en la modulación de la farmacocinética, distribución y suministro de las IgG en los diferentes sitios del cuerpo.

50 En los estudios para identificar el sitio de interacción de Fc con FcRn, se han llevado a cabo mutaciones de los fragmentos Fc (que comprenden el Fc y la región bisagra) que reducen las semividas en el suero de los fragmentos Fc correspondientes (Medesan y col, 1997; Kim y col, 1994a; Kim y col, 1999). Además, se han modificado los fragmentos Fc de IgG con afinidad aumentada por la unión con FcRn (Ghetie y col, 1997; Shields y col, 2001; Hinton y col, 2004) y estas moléculas tienen un aumento de persistencia en el suero de ratones (Ghetie y col, 1997) o monos *Cynomolgus* (Hinton y col, 2004).

60 Los dominios Fc de inmunoglobulina también tienen gran interés con fines de estudio de los mecanismos de interacciones de anticuerpos con otras moléculas del sistema inmunitario. Estos incluyen, dependiendo de la clase de anticuerpo, interacciones con el complemento, y unión a receptores específicos de otras células, incluyendo los macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Es importante un conocimiento más detallado de la biología de las regiones Fc para entender varios procesos moleculares del sistema inmunitario, tales como la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y las reacciones alérgicas.

65 La producción de un fragmento Fc de vida más larga o de un anticuerpo que tenga un aumento de unión a los receptores Fc es atractiva, ya que tal fragmento o anticuerpo se puede utilizar, por ejemplo, para marcar reactivos terapéuticos. Esto permite dosis menores del agente que se va a utilizar en terapia y posiblemente permite incluso

dosis más bajas del agente que se va a utilizar gracias al aumento de su persistencia en la corriente sanguínea. Adicionalmente, tales moléculas pueden ser útiles, por sí mismas, para la terapia contra agentes patógenos, cáncer y enfermedades autoinmunes. También se prevé que tales anticuerpos se transportarán más eficazmente a través de la placenta durante el tercer trimestre de gestación ya que el FcRn es activo en el transporte materno-fetal de IgG (Simister, 2003). Por lo tanto, se podrían suministrar anticuerpos protectores (por ejemplo, anti-patógenos) al feto en desarrollo.

Además, hay múltiples situaciones en las que sería deseable el aumento del aclaramiento de IgG de la circulación, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico en el que los anticuerpos autorreactivos producen una patología, y en situaciones en las que las toxinas o los fármacos se van a aclarar rápidamente del cuerpo utilizando un anticuerpo como agente aclarante. El aumento de aclaramiento de un anticuerpo se debería conseguir utilizando una molécula, tal como un anticuerpo modificado, que se une al FcRn con alta afinidad y no se disocia rápidamente a pH cercano a la neutralidad (a diferencia de los anticuerpo de origen natural). Tales anticuerpos no se liberarían de las células, sino que por el contrario se prevé que permanezcan unidos al FcRn y bloqueen la unión de otras IgG de afinidad menor. Como resultado, se bloquearía la función de FcRn, y las IgG endógenas o terapéuticas se dirigirían a la ruta lisosómica para la degradación (Ober y col., 2004b). La dirección de tales anticuerpos 'bloqueantes' contra FcRn también puede ser útil para evitar el transporte de anticuerpos patógenos (por ejemplo, autorreactivos) de la madre al feto durante la gestación.

El documento WO 02/060919 trata de moléculas, incluyendo IgG, inmunoglobulinas no IgG, proteínas y agentes no proteicos, que tienen un aumento de la semivida *in vivo* debido a la presencia de un dominio constante de IgG, o una porción del mismo que se une a FcRn, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad del dominio constante o el fragmento para FcRn. Tales proteínas y moléculas con aumento de la semivida tienen la ventaja de que se necesitan en cantidades menores y/o dosificaciones menos frecuentes en el uso terapéutico, profiláctico o diagnóstico de tales moléculas.

### Sumario de la invención

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula de IgG1 que comprende un dominio Fc, un dominio CH3 o un dominio Fc bisagra derivado de IgG1 humana que comprende Lys433, Phe434 y Tyr436. La molécula de IgG1 puede comprender además uno o más de Tyr 252, Thr 254 y Glu 256, específicamente Tyr 252, Thr 254 o Glu 256, Tyr 252 y Thr 254, Tyr 252 y Glu 256, Thr 254 y Glu 256, o Tyr 252, Thr 254 y Glu 256. La molécula IgG1 es una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, o una molécula de cadena pesada de IgG1, tal como una molécula de cadena pesada de longitud completa. La molécula de IgG1 puede unirse a un antígeno patógeno, tal como un virus, una bacteria, hongo, o un parásito. La molécula de IgG1 se puede unir también a una toxina a un anticuerpo autoinmune o a un anticuerpo anti-trasplante.

En otra realización, se proporciona un fragmento de una molécula de IgG1, en la que el fragmento es el dominio Fc de una IgG1 humana que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436.

En otra realización, se proporciona una molécula de IgG1 que comprende un dominio Fc, un dominio CH3 o un dominio Fc bisagra derivado de IgG1 humana que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436, para su uso en tasas de aclaramiento de IgG aumentadas en un sujeto que padece de anticuerpos patógenos o está siendo tratado con un anticuerpo para aclarar un fármaco tóxico o una toxina del cuerpo. La molécula de IgG1 puede además comprender uno o más de Tyr 252, Thr 254 y Glu 256, específicamente Tyr 252, Thr 254 o Glu 256, Tyr 252 y Thr 254, Tyr 252 y Glu256, Thr 254 y Glu 256, o Tyr 252, Thr 254 y Glu 256. La molécula de IgG1 es una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, o una molécula de cadena pesada de IgG1, tal como una molécula de cadena pesada de longitud completa.

En otra realización más, se proporciona una molécula de IgG1 que comprende un dominio Fc, un dominio CH3 o un dominio Fc bisagra derivado de IgG1 que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 o un fragmento de una molécula de IgG1 en el que el fragmento es el dominio Fc de una IgG1 humana que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436, para su uso en el bloqueo de la función de FcRn en un sujeto que padece autoinmunidad o que está expuesto a una transferencia de anticuerpos patógenos de la madre al hijo. La molécula de IgG1 puede comprender también uno o más de Tyr 252, Thr 254 y Glu 256, específicamente Tyr 252, Thr 254 o Glu 256, Tyr 252 y Thr 254, Tyr 252 y Glu 256, Thr 254 y Glu 256, o Tyr 252, Thr 254 y Glu 256. La molécula de IgG1 es una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, o una molécula de cadena pesada de IgG1, tal como una molécula de cadena pesada de longitud completa.

En otra realización más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de IgG1 que comprende un dominio Fc, un dominio CH3 o un dominio Fc bisagra derivado de IgG1 que comprende Lys433, Phe434 y Tyr436 o un fragmento de una molécula de IgG1 en el que el fragmento es el dominio Fc de una IgG1 humana que comprende Lys433, Phe434 y Tyr436 y un tampón, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La molécula de IgG1 puede comprender además uno o más de Tyr252, Thr254 y Glu256, específicamente Tyr252, Thr254 o Glu256, Tyr252 y Thr254, Tyr252 y Glu256, Thr254 y Glu256, o Tyr252, Thr254 y Glu256. La molécula de IgG1 es una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, o una molécula de cadena pesada de IgG1, tal como una molécula de cadena pesada de longitud completa. La molécula de IgG1 puede ser terapéutica o

profiláctica para un trastorno autoinmune o infección por un agente patógeno.

También se describe en el presente documento un método para proporcionar una IgG1 a un feto que comprende (a) proporcionar un molécula de IgG1 que comprende Lys433, Phe434 y Tyr436; y (b) poner en contacto dicha molécula de IgG1 con un sujeto que contiene un feto, en donde dicha molécula de IgG1 facilita la provisión de dicha molécula de IgG1 a través de dicha membrana placentaria a dicho feto. La molécula de IgG1 se puede conjugar con un agente terapéutico o diagnóstico. El agente terapéutico puede ser un antibacteriano, antivírico o antitoxina. El agente diagnóstico puede ser una marca fluorescente, una marca quimioluminiscente, o un cromóforo. La molécula de IgG1 puede ser una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, una molécula de cadena pesada de IgG1, una molécula de cadena pesada de longitud completa, o un fragmento de molécula de cadena pesada de longitud completa, tal como un péptido de 6 a aproximadamente 50 restos de longitud. La molécula de IgG1 puede ser terapéutica o profiláctica para un trastorno autoinmune o una infección por un agente patógeno.

También se describen en el presente documento métodos para bloquear la función de FcRn en un sujeto, suministrando a dicho sujeto una molécula de IgG o un fragmento de IgG de la misma que comprende una variante de región Fc con afinidad de unión aumentada y dependencia del pH reducida para FcRn. Cuya IgG o fragmento comprende una modificación de aminoácidos a uno o más de cualquiera de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 439 o 447 de la región Fc.

Además, se describen en el presente documento métodos de bloqueo de la función de FcRn en un sujeto proporcionando a dicho sujeto una molécula de IgG o un fragmento de IgG de la misma que comprende una variante de región Fc con afinidad de unión aumentada y dependencia del pH reducida para FcRn. Cuya IgG o fragmento comprende una modificación de aminoácidos a uno o más de cualquiera de las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 256, 288, 307, 309, 310, 311, 314, 348, 433, 434, 435, o 439 de la región Fc.

También se describen en el presente documento métodos para aumentar la semivida en el suero de una IgG1 en un sujeto que comprende proporcionar a dicho sujeto una molécula de IgG1 que comprende Lys433, Phe434 y Tyr436.

Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento se pueden implementar con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento. El uso de la palabra “uno” o “una” cuando se utilizan en conjunción con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. “Aproximadamente” significa un 5% más o menos del valor establecido.

Estas y otras realizaciones de la invención de la invención se apreciarán y entenderá mejor cuando se considere la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Se debería entender, sin embargo, que la siguiente descripción, mientras que indica varias realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de las mismas, se dan en forma de ilustración y no de limitación.

#### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y están incluidos para demostrar más ciertos aspectos de la invención. La invención puede entenderse mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas que se presentan en el presente documento:

**FIG. IA-B – Representación simplificada de modelos propuestos para el tráfico de FcRn en células polarizadas. FIG IA: Modelo de reciclado. FIG. IB: Modelo transcitótico**, en el que las IgG se transportan a través de las células (aunque la transcitosis se muestra solamente en dirección apical a basolateral, puede producirse en dirección basolateral a apical). Tanto el reciclado como la transcitosis pueden tener un papel en la regulación del nivel sérico de IgG, mientras que la transcitosis es importante para el suministro mediado por FcRn de IgG a través de las barreras celulares. Las IgG se captan por pinocitosis en fase líquida y penetran en los endosomas ácidos, en los que tienen la oportunidad de unirse a FcRn. Para ambos modelos, las IgG no unidas a FcRn se destinan a la degradación lisosómica. Las moléculas de FcRn se representan por ‘-’, las moléculas de IgG por ‘Y’.

**FIG. 2 – Mapa del plásmido del vector utilizado para expresar las cadenas pesadas de la IgG1 humana recombinante.** Los vectores para la expresión de las cadenas pesadas mutadas se generaron por clonación de casetes de cadena pesada de la región constante como fragmentos *Bgl*I en el sitio *Bam*H1 de un vector que contiene un dominio VH anti-lisozima (VH36) y genes del péptido director (LP). Este último vector, el vector que codifica los genes de la región constante de IgG humana de tipo silvestre fueron generosos regalos del Dr. Jefferson Foote (Foote y Winter, 1992). Los plásmidos que codifican las cadenas pesadas mutadas se transfectoron en la línea celular HuLys5 (HuLys5; Foote y Winter, 1992) que expresan una cadena ligera anti-lisozima. La línea celular HuLys5 fue proporcionada generosamente por el Dr. Jefferson Foote. Se indican las regiones a las que se dirige la mutagénesis en la presente invención.

**FIGS. 3A-F – La dependencia de las interacciones de FcRn humana y de ratón (hFcRn y mFcRn, respectivamente) con la IgG humana de tipo silvestre y las IgG humanas mutantes que contienen Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 (FIG. 3A-D) y Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433 y Phe 434 (con mantenimiento del resto tipo silvestre Tyr 436) (FIGS. 3E, F).** Los mutantes se indican por la siguiente nomenclatura: M252Y = metionina 252 (resto tipo silvestre) mutada en tirosina, etc. Las células en flujo por los chips del sensor BIAcore se acoplaron con IgG1 humana (silvestre o mutante) y hFcRn o mFcRn inyectados sobre la superficie a las concentraciones mostradas a un pH de 6,0 o un pH de 7,2 en solución salina fosfato tamponada (PBS) más un 0,01% de Tween 20. Se utilizó una tasa de flujo de 10  $\mu$ l/min para todos los experimentos. Todos los datos que se muestran se sustraen de las células de referencia. Las comparaciones de las **FIGS. 3A, 3B, 3E y 3F** indican que la adición de Tyr252, Thr254, Glu256 a la IgG1 humana que contiene Lys433, Phe434 y Tyr436 de como resultado una variante de IgG1 humana que se une a FcRn con menos dependencia del pH (se aprecian resultados similares para la unión a mFcRn; datos no mostrados). Además, la mutante que contiene Lys433, Phe434 y Tyr436 muestra menos dependencia del pH en la unión a mFcRn que a hFcRn (compárese las **FIG. 3A y 3C**).

**FIG. 4 – Aumento del aclaramiento de la IgG1 humana tipo silvestre (hIgG1) por la IgG1 humana mutada.** Se inyectó a ratones suizos (seis ratones/grupo) con IgG1 humana tipo silvestre marcada con  $^{125}$ I y se controló la persistencia de la IgG1 marcada por recuento corporal completo. Tres días más tarde (indicado por la flecha), se inyectó a los ratones por vía intravenosa con 500  $\mu$ g de IgG1 humana tipo silvestre o 500  $\mu$ g de IgG1 mutada que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436. Se determinaron los niveles de IgG1 humana marcada con  $^{125}$ I en los tiempos indicados por recuento corporal completo. Los datos que se muestran son medias de la radioactividad remanente en los diferentes grupos de ratones. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

**FIG. 5 – Aumento del aclaramiento de IgG endógenas por la IgG1 humana mutada que contiene Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436.** Los niveles séricos de IgG en los ratones Swiss Webster se cuantificaron por ELISA. Posteriormente se inyectaron los ratones (6 ratones/grupo) con 500  $\mu$ g de IgG1 humana mutada (hIgG1) que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 o 500  $\mu$ g de IgG1 humana de tipo silvestre y se controlaron los niveles de IgG en el suero en los tiempos indicados. La flecha indica el tiempo de inyección de la IgG1 humana (tipo silvestre o mutante). Los datos que se muestran son medias de los promedios de seis ratones por grupo de tratamiento con las desviaciones estándar indicadas por las barras de error. \* indica que los datos para estos puntos de tiempo son diferentes significativamente para cada uno de los dos grupos, con un valor de p (ensayo t de Student) < 0,05.

**FIG. 6 – Análisis del transporte de la IgG1 humana de tipo silvestre y una IgG1 humana mutada que contienen Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 (His 433 por Lys, Asn 434 por Phe; 'HN mutante') a través de placenta perfundida ex vivo.** Se premezclaron IgG biotiniladas y yodadas y se añadieron al compartimento materno. Se evaluó el transporte de cada IgG en el compartimento fetal desde los 30 min hasta los 240 min post-adición como se describe en los Métodos.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la clonación y expresión de moléculas de IgG1 humana modificadas para tener características mejoradas, tales como mejoría de la unión con FcRn, el aumento de la semivida sérica y la transferencia transplacentaria o el transporte a través de otras barreras celulares. La invención también se refiere a la generación de anticuerpos modificados que tienen la capacidad de bloquear la función de FcRn. Más específicamente, la invención se ejemplifica por la producción de varias moléculas de IgG1 mutantes que tienen una combinación beneficiosa de restos tipo salvaje y alterado.

Se desvelan en el presente documento vectores que codifican moléculas de IgG1 humana. Estas construcciones de ADN y proteínas codificadas de esta manera se prevén que tienen varios usos, tales como la producción de inmunoterapias u otras proteínas recombinantes estables, o para proporcionarlas a sujetos como terapia.

#### 1. Dominios constantes de anticuerpo

Se ha aislado FcRn de los bordes en cepillo del epitelio del duodeno de ratas lactantes (Rodewald y Kraehenbuhl, 1984; Simister y Rees, 1985) y los correspondientes genes clonados tanto de FcRn humano como de ratón (Simister y Mostov, 1989a; Simister y Mostov, 1989b; Ahouse y col., 1993). Este receptor Fc comprende un heterodímero de dos polipéptidos de 51 kDa y 14 kDa. De manera interesante, el componente de 14 kDa es  $\beta$ 2-microglobulina y el componente de 51 kDa es homólogo a la cadena pesada de las proteínas del MHC Clase I. La proteína se puede expresar en grandes cantidades en forma recombinante y se ha analizado por cristalografía de rayos x (Burmeister y col., 1994a; Burmeister y col., 1994b; Martin y col., 2001). De manera importante, los ortólogos de FcRn se han aislado de múltiples especies incluyendo los seres humanos (por ejemplo, Story y col., 1994; Kacs Kovics y col., 2000), indicando que el FcRn está presente a lo largo de especies de mamíferos.

Las moléculas Fc recombinantes, y los fragmentos derivados de las regiones constantes de la IgG murina, se pueden expresar a partir de células huésped. Estas moléculas y sus fragmentos se pueden purificar, radiomarcarse y utilizar en estudios de aclaramiento en ratones. Estas regiones se pueden emplear también en quimeras proteicas, o proteínas de fusión, para producir agentes terapéuticos biológicamente estables. Esto es particularmente útil para la producción de agentes terapéuticos que no se pueden obtener a partir de otros sistemas de expresión, tales como células de mamíferos, debido a la proteólisis. De esta manera, los dominios Fc de la presente invención, o porciones de los mismos, se proponen como módulos útiles tanto para la estabilización y suministro de moléculas recombinantes, incluyendo las proteínas quiméricas de uso terapéutico.

## 10 2. Mejora de las características de las IgG1

El mantenimiento de las concentraciones de IgG en el suero a un nivel prácticamente constante es importante para la inmunidad eficaz. Además, los niveles de IgG del suero anormalmente altos (hipergamaglobulinemia) o bajos (hipogamaglobulinemia) dan como resultado síntomas clínicos. Para ser eficaz, el mecanismo homeostático que siente y regula los niveles de IgG en el suero debe ser capaz de encargarse de la producción continua o variable de moléculas de IgG en las células B del organismo. El cómo se lleva a cabo tal homeostasis aún no está claro, y se han propuesto varios mecanismos que influyen en el control de los niveles de IgG en el suero (Brambell y col., 1964; Brambell, 1966; Ghetie y col., 1981). Claramente, cualquier modelo tiene que invocar un sistema de retroalimentación que sea sensible y responda a cambios de los niveles de IgG en el suero. Además, el transporte de IgG a través de las barreras celulares es un proceso importante en la mediación de la inmunidad humoral protectora, y está más probablemente relacionado estrechamente con el proceso que regula los niveles de IgG en el suero.

Las características de una molécula de inmunoglobulina que determinan la estabilidad y otras propiedades *in vivo* han sido objeto de muchos estudios. El modelo actual para cómo se regulan los niveles de IgG en el cuerpo es que el receptor Fc, FcRn. Se une a las IgG y las transportan en y a través de las células. La unión a FcRn por las IgG de origen natural es dependiente del pH, con una unión mucho más fuerte a pH 6,0 que a pH 7,2-7,4 (Raghavan y col., 1995; Popov y col., 1996; Zhou y col., 2003). En la mayoría de los tipos celulares el pH en la superficie celular está cerca de la neutralidad y como resultado, no permite las interacciones FcRn-IgG. De esta manera las IgG se captan en las células por pinocitosis de fase líquida más que por captación mediada por el receptor. Si, a continuación de la captación por pinocitosis de fase líquida, las IgG no se unen al FcRn entonces se someten a degradación lisosómica (Ober y col., 2004b). Después del reciclado o transcitosis por FcRn, las IgG se liberan por exocitosis en la superficie celular (Ober y col., 2004a). Por lo tanto, y coherentemente con el modelo anterior propuesto por Brambell y sus colegas antes de la identificación de FcRn y el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de la función de FcRn (Brambell y col., 1964; Brambell, 1966), las células que son responsables de la destrucción de las IgG también están implicadas paradójicamente en la protección de las IgG contra la destrucción.

El FcRn se expresa en múltiples sitios por todo el cuerpo (por ejemplo, endotelio, epitelio, monocitos, células dendríticas), y de esta forma sirven no solo para regular los niveles de IgG actuando como un receptor de recuperación (revisado en Ghetie y Ward, 2000), sino que también tiene un papel en el transporte de IgG a través de las barreras celulares (Antohe y col., 2001; McCarthy y col., 2000; Spiekerman y col., 2002; Dickinson y col., 1999; Kobayashi y col., 2002; Yoshida y col., 2004). De acuerdo con la idea de que el FcRn tiene un papel crucial en la regulación de niveles de IgG en el suero, las IgG o fragmentos Fc se aclaran rápidamente de la circulación de ratones que son deficientes en la expresión de FcRn funcional (Ghetie y col., 1996; Junghans y Anderson, 1996; Israel y col., 1996). Al contrario, el aumento de la afinidad de una IgG por el FcRn prevería un aumento de la semivida sérica, y el presente inventor ha descrito IgG mutantes con semivida sérica mejorada (Patente de EE. UU. 6.227.375; Ghetie y col., 1996). Tales anticuerpos también se esperarían que se transportan más eficazmente a través de las barreras celulares.

Además, las IgG que están modificadas para unirse con afinidad más alta y que se disocian más lentamente que sus moléculas parentales del FcRn serían capaces de bloquear la función de FcRn. Tales anticuerpos se pueden tener de esta manera usos terapéuticos en situaciones en las que es deseable reducir los niveles de IgG en el cuerpo, por ejemplo, en enfermedades en las que están implicados anticuerpos patógenos o en el aclaramiento de moléculas tóxicas mediado por anticuerpos.

## 55 3. Sitio catabólico de la molécula de IgG

El sitio(s) en el que se catabolizan las IgG y las proteasas implicadas están aún por caracterizar. Se ha demostrado que tanto el hígado como el tracto digestivo tienen un papel en el catabolismo de IgG (Covell y col., 1986; Hopf y col., 1976; Dobre y Ghetie, 1979) pero ningún órgano, sin embargo, se ha demostrado que sea el sitio principal de catabolismo. Por lo tanto, se tiene que considerar la posibilidad de un catabolismo difuso por todo el cuerpo (Waldmann y Strober, 1969). Esto es también consistente con la naturaleza ubicua de la expresión de FcRn en el endotelio y epitelio (revisado en Ghetie y Ward, 2000). Es posible que tal catabolismo difuso podría producirse en el sistema endotelial por todo el cuerpo ya que las células de este sistema están en estrecho contacto con el espacio intravascular y la IgG atraviesa constantemente las células endoteliales para entrar en el espacio extravascular (Ghetie y col., 1996). Consecuente con estos, los datos recientes apoyan la noción de catabolismo difuso con

probable implicación de células endoteliales (Borvak y col., 1999; Ober y col., 2004a, 2004b).

#### 4. Transferencia de IgG a través de membranas (Transcitosis)

5 Como parte de la presente invención, se contempla que se conseguirá la provisión de anticuerpos en la inmunidad pasiva. En particular, se contempla la mejora de la transferencia a través de las células y la persistencia en el suero de los anticuerpos. En otra realización, se prevé el bloqueo del transporte de IgG en (reciclaje) o a través (transcitosis) de las células utilizando IgG que están diseñadas para bloquear la función de FcRn. Se proporciona posteriormente una exposición de varias realizaciones de transferencia transcelular.

10

##### A. Transferencia intestinal en recién nacidos

Un receptor Fc, que se sabe ahora que es el FcRn, se implicó originalmente en la transferencia de IgG desde el calostro o leche a la corriente sanguínea de las ratas y ratones recién nacidos (Brambell, 1966; Rodewald, 1976; Kim y col., 1994). Consecuente con el concepto de que el FcRn es el receptor de transporte, las IgG maternas no se suministran a las crías en ratones que no expresan FcRn funcional (Israel y col., 1995). Por lo tanto, los datos disponibles indican que la transcitosis de IgG en ratas, ratones y seres humanos se lleva a cabo por receptores similares y como consecuencia comparten un mecanismo común.

15

20

El mecanismo propuesto de transporte trans-intestinal es similar al descrito anteriormente (sección 2), con la excepción de que la luz intestinal está a un pH (6,0-6,5) que permite las interacciones FcRn-IgG: el FcRn del lado luminal de las células epiteliales se une a la IgG y los complejos FcRn-IgG se transportan a través de la célula hacia la superficie basolateral donde se produce la exocitosis en la corriente sanguínea del roedor recién nacido. Se ha postulado que la asociación de la IgG con el FcRn al transitar por la célula protege la IgG de la degradación lisosómica. El pH del plasma (7,3) da como resultado la liberación de la unión de la IgG en la circulación, consecuente con la dependencia del pH de la interacción FcRn-IgG (Raghavan y col., 1995; Popov y col., 1996)

25

##### B. Transferencia a través del saco vitelino murino (Transferencia materno-fetal)

El FcRn murino se expresa a altos niveles tanto en el intestino neonatal como en el saco vitelino (Ahouse y col., 1993), y un FcR que es estructuralmente similar al FcRn también se ha aislado del saco vitelino de rata (Roberts y col., 1993). Estos datos sugieren fuertemente que el transporte materno-fetal e intestinal se lleva a cabo por el FcRn, aunque la localización celular de la unión de IgG al FcRn parece ser diferente en los dos procesos (Roberts y col., 1993). Consecuente con la implicación del FcRn, las IgG maternas no se transportan al feto en desarrollo en ratones con carencia de FcRn funcional (Israel y col., 1995). En ratas, el FcRn del saco vitelino se localiza en vesículas en el citoplasma apical y basolateral, y no en la superficie luminal de las células endodérmicas del saco vitelino (Roberts y col., 1993). La diferencia en la localización se cree que es necesaria porque el pH de la luz que rodea el saco vitelino es ligeramente básico (Roberts y col., 1993), y la afinidad de unión del FcRn a la IgG es baja a este pH (Raghavan y col., 1995; Popov y col., 1996); por tanto, se ha sugerido que la IgG materna se capta por las células del saco vitelino en una etapa endocítica no específica y entonces se une al FcRn en un compartimento endosómico ligeramente ácido. El suministro de IgG en la circulación fetal se propone entonces que ocurre de forma similar a la de la transcitosis intestinal (Roberts y col., 1993).

30

35

40

Estudios más recientes demuestran que para el transporte de una IgG a través de la placenta, la unión al FcRn humano es esencial (Firan y col., 2001), que implica al FcRn en la transferencia materno-fetal en seres humanos. Por lo tanto se espera que la transferencia materna de inmunidad pasiva a los bebés se mejore si aumenta la afinidad de la interacción FcRn-IgG (o Fc) y se alarga la persistencia en el suero. Para aumentar la persistencia en el suero y la transferencia materno-fetal de una IgG terapéutica, es preferible dotar esa IgG con una afinidad más alta para la unión a los receptores Fc tales como el FcRn que están implicados en los procesos. Como resultado, la alta afinidad de las IgG debería ser capaz de competir con las altas concentraciones de IgG endógenas (aproximadamente de 5 mg/ml en ratones y 10 mg/ml en seres humanos). De manera análoga, el bloqueo de la función de FcRn utilizando IgG modificadas (o fragmentos de las mismas) puede ser útil para evitar la transferencia de anticuerpos maternos perjudiciales al feto.

45

50

55

##### C. Transporte mediado por FcRn a través de barreras epiteliales

El FcRn se identificó originalmente como el receptor que transporta IgG a través de las células epiteliales del intestino neonatal, en donde el FcRn se expresa en gran cantidad. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que el FcRn es funcionalmente activo en células epiteliales adultas de diversos orígenes tales como intestinal, bronquial y epitelio renal (Spiekerman y col., 2002; Dickinson y col., 1999; Kobayashi y col., 2002; Yoshida y col., 2004). Significativamente, el FcRn puede transportar proteínas de fusión Fc a través del epitelio bronquial (Spiekermann y col., 2002; Bitonti y col., 2004), y también tiene un papel en el suministro de complejos antígeno-anticuerpo a través del intestino (Yoshida y col., 2004). El último proceso puede tener un papel importante en iniciar respuestas inmunitarias contra los antígenos de la mucosa. Por lo tanto, el FcRn está implicado en el transporte de IgG (y su antígeno unido; Yoshida y col., 2004) a distintos sitios del cuerpo durante la vida adulta.

60

65

La presente invención tiene relevancia para la función de transporte de FcRn. Por ejemplo, los anticuerpos con propiedades de unión mejoradas para el FcRn pueden transportarse más eficazmente a través del intestino y pulmón en el adulto, proporcionando una vía de suministro para IgG terapéuticas. De manera alternativa, las IgG que bloquean la función de FcRn pueden ser útiles para el bloqueo de, por ejemplo, el FcRn bronquial que puede estar relacionado con el bloqueo de respuestas alérgicas.

### 5. Sitio de interacción de la molécula de IgG para el FcRn

De entre las clases de Ig (IgA, IgE, IgM, IgD y IgG), la molécula de IgG tiene la semividua más larga *in vivo* (Zuckier y col., 1990). La región de la molécula de IgG que regula la persistencia en el suero se sabe desde hace décadas que reside en el fragmento Fc. Este trabajo, llevado a cabo inicialmente por Spiegelberg y Weigle (1966) y después conformado por muchos otros (revisado por Zuckier y col., 1990), que indican que el fragmento Fc producido por la proteólisis tiene la misma semividua *in vivo* que la molécula de IgG completa. Los trabajos de Dorrington y sus colegas (Dorrington y Painter, 1974; Ellerson y col., 1976; Yasmeen y col., 1976) demostraban que el fragmento del dominio CH2 producido por la digestión con tripsina tenía la misma semividua que la molécula de IgG completa. Aunque tanto los datos anteriores como los más recientes sugieren que el dominio CH2 está implicado en la regulación de la persistencia de IgG en el suero, algunos de estos datos no son incoherentes con la implicación adicional del dominio CH3 (Arend y Webster, 1977; Dima y col., 1983; Mueller y col., 1990; Kim y col., 1994a; Batra y col., 1993). Además, otro trabajo ha indicado que el dominio CH2 y en menor medida el dominio CH3, contienen secuencias que controlan la persistencia de las moléculas de IgG en el suero (Kim y col., 1994a; Pollock y col., 1990; Kim y col., 1994c). En particular, se ha utilizado mutagénesis dirigida al sitio para identificar los restos de aminoácidos en la interfase de los dominios CH2-CH3 que son críticos para el mantenimiento de los niveles de IgG1 en el suero en ratones (Kim y col., 1994a; Medesan y col., 1997), y estos estudios por lo tanto han dado como resultado la localización precisa del sitio de unión al FcRn. Los restos implicados en la unión al FcRn se conservan altamente tanto en los isotipos humanos como murinos (Kim y col., 1994a; Tabla I), y análisis de moléculas de IgG1 humana (o fragmentos Fc) y variantes mutadas indican que están implicados restos similares de IgG en la unión al FcRn en seres humanos (Kim y col., 1999; Shields y col., 2001). El mapeo del sitio de interacción con FcRn en IgG por mutagénesis dirigida al sitio también concuerda con la estructura cristalográfica por rayos x de alta resolución del FcRn de rata en forma de complejo con el Fc de rata (IgG2a), lo que demuestra que los restos 252, 253, 254, 288, 307, 309, 310, 311, 314, 348, 433, 434, 435, 436 y 439 de la IgG tienen contacto en distintos grados con el FcRn (incluyendo los contactos con los carbohidratos del FcRn sobre el Fc) (Martin y col., 2001).

La implicación de His 310, His 435 e His 436 (Tyr en IgG1 humana) de la molécula de IgG1 en la interacción con el FcRn explica, en parte al menos, la dependencia del pH de la interacción FcRn-Fc (Kim y col., 1994b; Raghavan y col., 1995). A pesar de las similitudes de los sitios de interacción con el FcRn en las IgG entre especies, estudios recientes han demostrado que el FcRn humano y de ratón pueden mostrar diferencias en la especificidad de unión (Ober y col., 2001). La mutagénesis dirigida al sitio se ha utilizado recientemente para determinar la base molecular de esto (Zhou y col., 2003; 2005).

La región del Fc que está implicada en la unión al FcRn (Kim y col., 1994a; Medesan y col., 1997; Martin y col., 2001) es distinta de los sitios implicados en la unión con los receptores Fc $\gamma$ RI, RII y RIII (los "clásicos" FcR), ya que estos reconocen secuencias localizadas primariamente en la región inferior de bisagra (Duncan y col., 1988; Lund y col., 1992; Sarmay y col., 1992; Jefferis y col., 1990; Canfield y Morrison, 1991; Wawrzynczak y col., 1992). Además, el sitio de interacción con el FcRn es distinto del sitio de unión al del factor C1q de complemento (Glu 318, Lys 320 y Lys 322) (Wawrzynczak y col., 1992; Duncan y Winter, 1988). Por lo tanto, la mutación del sitio de interacción con FcRn no debería afectar la fijación del complemento ni la unión con Fc $\gamma$ RI, RII y RIII.

**Tabla I**  
**Secuencias de IgG murina y humana en proximidad del sitio de interacción con el FcRn**

	252-254	308-312	433-436**
mIgG1*	TIT	IMHQD	HNHH
mIgG2a	MIS	IQHQD	HNHH
mIgG2b	MIS	IQHQD	KNYY
IgG3	MIS	IQHQD	HNHH
hIgG1 <sup>+</sup>	MIS	VLHQD	HNHY
hIgG2	MIS	WHQD	HNHY
hIgG3	MIS	VLHQD	HNRF
hIgG4	MIS	VLHQD	HNHY

\* mIgG1 = IgG1 murina, <sup>+</sup> hIgG + IgG1 humana

\*\* La mutación simultánea de His 433 y Asn 434 tenía un efecto, pero no se observó ningún efecto con mutaciones sencillas, His 433 en Ala 433 y Asn 434 en Ala 434, (Medesan y col., 1997).

Están subrayados los restos de IgG1 murina o IgG1 humana que se habían mutado y se había descubierto que afectaban a las tasas de aclaramiento en ratones (Kim y col., 1994a; Kim y col., 1999).



## 6. Diferencias entre las secuencias en el sitio de interacción del dominio CH3 de IgG

De los restos de IgG que se muestran en la Tabla I que están implicados en la unión con FcRn, las diferencias más marcadas están en el dominio CH3. Esto permite que se correlacionen las diferencias de secuencia con las posibles diferencias funcionales. Por ejemplo, se ha demostrado que la IgG2b tiene una tasa de aclaramiento más rápida que IgG1, IgG2a e IgG3 (Pollock y col., 1990). El análisis de las diferencias de secuencia de los restos de la interfase de los dominios CH2-CH3 que se ha demostrado que son importantes en la construcción del sitio de interacción con FcRn indican que en la IgG2b murina, His433, His435, His436 de IgG1 murina, IgG2a y IgG3 están sustituidos por Lys 433, Tyr 435 y Tyr 436 (Tabla I). Estas diferencias de secuencia proporcionan un sistema ideal para analizar el papel de las posiciones 433, 435 y 436 en el control de la semivida sérica y el transporte de IgG. La conversión de la lisina 433 en His 433, tirosina (tyr) 435 en his 435 y tyr 436 en his 436 en una molécula de IgG2b da como resultado una IgG2b mutada que tiene la misma semivida *in vivo* que la IgG1 murina (Patente de EE. UU. 6.227.375). Sin embargo, los estudios comparativos de unión de la IgG1 de ratón e IgG2b de ratón indican que estas diferencias de secuencia dan como resultado una pérdida de dependencia del pH de la interacción FcRn-IgG correspondiente, más que una reducción de la afinidad (Raghavan y col., 1995; Zhou y col., 2003). Esto, junto con los estudios de Dall'Acqua y col (2002), indican que la reducción de la dependencia del pH puede dar como resultado una persistencia sérica disminuida, más probablemente debido a la liberación ineficaz de las moléculas de IgG del FcRn asociado a las células durante la exocitosis (Ober y col., 2004a).

La mutación individual de His 433 en Ala y Asn 434 en Ala/Gln no tiene efecto sobre la unión al FcRn, la semivida sérica o la transcitosis (Patente de EE. UU. 6.227.375; Medesan y col., 1997), aunque la His 433 y Asn 434 se ha demostrado que contactan con el carbohidrato en FcRn en la estructura del complejo FcRn-Fc de rata (Martín y col., 2001). En estudios anteriores (Kim y col., 1994a; 1994c), se apuntaba que la doble mutación de His 433, Asn 434 de la IgG1 de ratón tenía un efecto moderado en las funciones mediadas por FcRn en los ratones. Esta variación se debe probablemente a la perturbación de los restos críticos adyacentes tales como His 435 por la doble mutación (mientras que las mutaciones sencillas son menos perturbadoras) más que por la implicación central de 433 y 434 en la interacción FcRn-IgG (o Fc). Estos restos están por tanto en proximidad con los restos que son esenciales para la interacción FcRn-IgG, y son buenas dianas potenciales para la mejora de afinidad (utilizando una estrategia similar que la que se describe en Ghetie y col. (1997) cuando se dirige la mutagénesis a los restos que flanquean el resto clave 253 de la IgG).

De acuerdo con la presente invención, la combinación particular de Lys433, Phe434 y Tyr436 (mutante/mutante/tipo silvestre) proporciona un aumento de ~ 6 veces del FcRn humano a la IgG1 humana con respecto al tipo silvestre, mientras que retiene la dependencia del pH de la unión a ese receptor, un transporte placentario mejorado, y presumiblemente una semivida sérica mejorada. La adición de más mutaciones en Tyr252, Thr254, y Glu256 que flanquean el residuo central Ile 253 reduce sustancialmente la dependencia del pH de la unión al FcRn humano, y aumenta ~ 30 veces la afinidad por este receptor con respecto al tipo silvestre.

## 7. Dominios de anticuerpo modificados con semividas *in vivo* extendidas

Se ha dirigido recientemente mucho interés hacia la modulación de las propiedades (farmacocinéticas, distribución, etc.) de los anticuerpos por mutagénesis dirigida al sitio para alterar la fuerza de la interacción FcRn-IgG (Ghetie y col., 1997; Shields y col., 2001; Dall'Acqua y col., 2002; Hinton y col., 2004). Se han identificado los restos de IgG implicados en la construcción del sitio de interacción con el FcRn tanto en IgG1 de roedores como humana (Tabla I y Sección 5 anteriormente). Estos datos no descartan la implicación de restos adicionales del fragmento Fc en la regulación de los niveles de IgG y el transporte mediado por FcRn, pero proporcionan un claro medio por el que la semivida biológica, transporte, etc. de un anticuerpo o una molécula basada en anticuerpo o conjugado se pueda acortar. También se proporciona un medio por el que la longevidad de un anticuerpo en particular se puede aumentar si se desea, reinsertando restos tales como Ile253, His310, His435 y His436, se debería encontrar mutado cualquiera de estos restos en un anticuerpo en particular, por ejemplo, IgG2b. De manera importante, la mutagénesis aleatoria de restos que flanquean estos aminoácidos clave, seguida por selección, puede dar lugar a un fragmento Fc con semivida sérica aumentada (Patente de EE. UU. 6.227.375; Ghetie y col., 1997; Hinton y col., 2004).

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que una combinación particular de mutaciones proporciona moléculas de IgG1 humana con propiedades únicas. Cuando se cambia His 433 por Lys y Asn 434 se cambia por Phe, pero la Tyr 436 se mantiene, la molécula de IgG1 humana muestra una afinidad de unión al FcRn humano ~ 6 veces más alta con respecto al tipo silvestre. De manera importante, se mantiene la unión al FcRn dependiente del pH. Utilizando un modelo *ex vivo* de transporte placentario, se demostró un aumento del transporte a través de la barrera placentaria, y se predijo que tenía una persistencia en el suero mejorada. También se esperaba que se transportara más eficazmente a través de las células que expresan FcRn, tales como los epitelios bronquial e intestinal (Spiekerman y col., 2002; Dickinson y col., 1999; Yoshida y col., 2004). La invención reivindicada es ampliamente aplicable a un número casi ilimitado de usos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o trastornos, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunidad, cáncer y rechazo de trasplantes.

## 8. Modificación de moléculas de anticuerpo con función de bloqueo del FcRn

Como se ha descrito anteriormente, el FcRn salvaguarda las moléculas de IgG de la degradación y transporta estas moléculas en y a través de las células. El bloqueo de la unión del FcRn a las IgG puede por lo tanto ser deseable en situaciones en las que están presentes anticuerpos patógenos (por ejemplo, autorreactivos), o cuando un anticuerpo se utiliza para aclarar un fármaco tóxico o una toxina del cuerpo. La adición de otras mutaciones Met 252 Tyr, Ser 254 Thr, y Thr 256 Glu a las mutaciones de His 433 Lys, Asn 434 Phe en la IgG1 humana reducen sustancialmente la dependencia de la unión al FcRn humano al pH, con un aumento de la afinidad de aproximadamente 30 veces con respecto al anticuerpo de tipo silvestre. Este anticuerpo puede bloquear la función del FcRn en ratones y aumentar las tasas de aclaramiento de IgG. Tales anticuerpos bloqueantes del FcRn tienen un gran número de usos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o trastornos, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento de autoinmunidad o el bloqueo de la transferencia de anticuerpos patógenos (autorreactivos) de la madre al hijo.

## 9. Mutagénesis

De acuerdo con la presente invención, la mutagénesis de los genes de la región constante de IgG se puede llevar a cabo utilizando mutagénesis específica del sitio o dirigida al sitio. La mutagénesis específica del sitio es una técnica útil en la preparación de proteínas o péptidos individuales, o equivalentes a proteínas o péptidos biológicamente funcionales, por medio de mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una capacidad rápida para preparar y ensayar variantes de secuencias, incorporar una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos que codifiquen la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia cebadora de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de eliminación que se está atravesando. Típicamente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 restos en ambos lados de unión de la secuencia que se va a alterar.

En general, la técnica de mutagénesis dirigida al sitio se conoce bien en la técnica. Como se apreciará, la técnica puede emplear un vector bacteriófago que existe en forma de cadena sencilla y de doble cadena. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores fagos están disponibles comercialmente y su uso se conoce bien en general por los expertos en la técnica. Los plásmidos bicatenarios se pueden emplear también de forma rutinaria en la mutagénesis dirigida al sitio, utilizando la PCR™, que elimina la etapa de transferencia del gen de interés desde un fago a un plásmido.

En general, la mutagénesis dirigida al sitio se lleva a cabo obteniendo primero un vector monocatenario, o con la fusión de dos cadenas de un vector de doble cadena que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Un cebador oligonucleótido que tiene la secuencia mutada deseada se prepara sintéticamente. El cebador se hibrida entonces con la preparación de ADN monocatenario, y se somete a enzimas polimerizantes de ADN tales como el fragmento Klenow polimerasa I de *E. coli*, con el fin de completar la síntesis de la cadena que tiene la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia no mutada original y la segunda cadena tiene la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza entonces para transformar las células apropiadas, tales como las células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyen los vectores recombinantes que tienen la disposición de la secuencia mutada.

De manera alternativa, se puede utilizar la mutagénesis dirigida por la PCR™ de ADN de doble cadena. Tales mutantes se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, por síntesis directa del fragmento Fc por aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como la tecnología de PCR™ de la Patente de EE. UU. 4.603.102.

La preparación de las variantes de secuencia del gen seleccionado utilizando mutagénesis dirigida al sitio se proporciona como un medio de producción de especies potencialmente útiles y no significa que esté limitada, ya que hay otras formas en las que se pueden obtener las variantes de secuencia de genes. Por ejemplo, se pueden tratar los vectores recombinantes que codifican el gen deseado con agentes mutágenos, tales como la hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

## 10. Terapéuticos

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la práctica de la presente invención y no se pretende que sean limitantes. Ya que la invención se demuestra con una variedad de dominios tipo inmunoglobulina, incluyendo la IgG1 humana o dominios bisagra Fc, Fc, bisagra CH2 y CH3 derivados de IgG1 humana; y anticuerpos mutados (o fragmentos) con aumento de la persistencia *in vivo*; y moléculas mutadas con aumento del transporte a través de las barreras celulares; y moléculas mutadas con la capacidad de bloquear la función de FcRn; se entenderá que otras proteínas o péptidos se adaptarán a construcciones similares a las descritas en el presente documento. Así mismo, se pueden emplear una variedad de marcadores, secuencias enlazadoras y secuencias directoras dependiendo de los métodos particulares de purificación o aislamiento deseados para obtener los productos polipeptídicos.

## A. Inmunoterapia pasiva

La protección de seres humanos contra los agentes infecciosos por inmunoterapia pasiva es atractiva, ya que proporciona una protección inmediata. Por el contrario, la vacunación activa necesita aproximadamente 7-10 días para que se generen los anticuerpos protectores. Sin embargo, una limitación importante de la inmunización pasiva es que la protección tiene una vida relativamente corta, debido al aclaramiento de los anticuerpos protectores de la circulación. Los anticuerpos anti-patógenos protectores que tuvieran una vida más larga en la circulación serían por tanto atractivos, y esta invención se refiere directamente a esta aplicación. Tales anticuerpos se utilizarían tanto como terapia en individuos infectados, así como en la profilaxis en el caso de probable exposición a un agente infeccioso.

Además, la infección del recién nacido es de especial preocupación. El suministro pasivo de anticuerpos protectores que se produce durante el tercer trimestre a través de la barrera materno-fetal al feto se podría utilizar como una vía para suministrar anticuerpos protectores, pero la eficacia del transporte está limitada por competición con las IgG maternas (que pueden no proteger contra es agente patógeno específico). Esta invención ofrece una forma de aumentar la ventaja competitiva de un anticuerpo protector sobre los anticuerpos endógenos maternos al atravesar la placenta.

Los posibles agentes patógenos a los que se pueden dirigir incluyen, pero sin limitarse a estos, Bacillus anthracis, virus Nilo oeste, citomegalovirus y virus sincitial respiratorio.

Por el contrario para aumentar las semividas séricas de anticuerpos, un aspecto adicional de la presente invención es la inducción del aclaramiento rápido de anticuerpos del cuerpo bloqueando la función de FcRn. La exposición a las toxinas tales como veneno de serpiente se puede tratar con anticuerpos anti-veneno. De manera similar, las sobredosis de fármacos tales como digoxina se tratan actualmente con fragmentos Fab anti-digoxina (DigiFab™). Tras el suministro del anticuerpo y la formación del complejo con la toxina o el fármaco, puede ser deseable inducir un rápido aclaramiento de los complejos anticuerpo-toxina del cuerpo. La presente invención describe una modalidad de inducir un rápido aclaramiento de tales complejos, generando anticuerpos, que a través de su región Fc, se unen fuertemente y con menos dependencia del pH al FcRn.

## B. Estados de enfermedad

Se producen varios estados de enfermedad como resultado de la producción de inmunoglobulinas excesivas o aberrantes (es decir, patológicas). La presente invención puede, en una realización, utilizarse para tratar tales enfermedades.

**Lupus eritematoso sistémico (SLE).** El SLE es una enfermedad reumática autoinmune que se caracteriza por el depósito en los tejidos de anticuerpos en complejos inmunitarios dando lugar a lesiones en el tejido (Kotzin, 1996). A diferencia de enfermedades autoinmunes tales como la MS y la diabetes mellitus tipo 1, el SLE implica potencialmente múltiples sistemas orgánicos directamente, y sus manifestaciones clínicas son diversas y variables (revisado por Kotzin y O'Dell, 1995). Por ejemplo, algunos pacientes pueden demostrar primariamente una erupción cutánea y dolor articular, mostrar remisiones espontáneas, y requerir poca medicación. En el otro extremo del espectro hay pacientes que demuestran una implicación renal grave y progresiva que requiere terapia con altas dosis de esteroides y fármacos citotóxicos tales como ciclofosfamida (Kotzin, 1996). Más recientemente se ha intentado el tratamiento con rituximab (anti-CD20; un marcador de células B).

La evidencia serológica del SLE, y el ensayo diagnóstico primario disponible, es la elevación de los niveles séricos de anticuerpos IgG contra los constituyentes del núcleo celular, tal como el ADN de doble cadena (dsADN), el ADN de cadena sencilla (ss-ADN), y la cromatina. Entre estos autoanticuerpos, la IgG anti-dsADN tiene el papel principal en el desarrollo del lupus glomerulonefrítico (Tsao y Hahn, 1994; Ohnishi y col., 1994). La glomerulonefritis es una afección grave en la que las paredes de los capilares de las paredes de los glomérulos renales purificantes de la sangre se engrosan por acúmulos en el lado epitelial de las membranas basales glomerulares. La enfermedad a menudo crónica y progresiva puede dar lugar a un fallo renal eventual.

Los mecanismos por los que se inducen los autoanticuerpos en estas enfermedades autoinmunes permanecen sin aclarar. Como no se conoce la causa del SLE, sobre la que se podría dirigir el diagnóstico y/o el tratamiento, el tratamiento se dirige a suprimir las respuestas inmunitarias, por ejemplo, con antibióticos macrólidos, más que a una causa subyacente (por ejemplo, Patente de EE. UU. 4.843.092).

**Artritis reumatoide (RA).** La etiología exacta de la RA permanece desconocida, pero los primeros signos de enfermedad articular aparecen en la capa de revestimiento sinovial, con proliferación de los fibroblastos sinoviales y su anclaje en la superficie articular del margen articular (Lipsky, 1998). Posteriormente se reclutan macrófagos, células T y otras células inflamatorias en la articulación donde producen varios mediadores incluyendo las citoquinas interleucina-1 (IL-1), que contribuyen a las secuelas crónicas que dan lugar a la destrucción del hueso y el cartílago, y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), que tiene un papel en la inflamación (Dinarello, 1998; Arend y Dayer, 1995; van den Berg, 2001). El anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  Remicade™ ha demostrado tener eficacia en el tratamiento de la AR

(Vilcek y Feldmann, 2004).

**Síndrome de Sjören.** El síndrome de Sjören es una enfermedad autoinmune sistémica en la que el sistema inmunitario del cuerpo ataca erróneamente sus propias glándulas productoras de humedad. El Sjören es uno de los trastornos autoinmunes más prevalentes, afectando a unos 4.000.000 de americanos, siendo el 90% de los pacientes mujeres. La media de edad de aparición es al final de los 40 aunque el Sjören se produce en todos los grupos de edad tanto en mujeres como en hombres.

Aproximadamente el 50% de las veces el síndrome de Sjören aparece solo, y el 50% de las veces se produce en presencia de otra enfermedad del tejido conectivo. Los cuatro diagnósticos más comunes que co-existen con el síndrome de Sjören son Artritis Reumatoide, Lupus sistémico, Esclerosis Sistémica (escleroderma) y Polimiositis/Dermatomiositis. A veces los investigadores se refieren a estas situaciones como "Sjören Secundario".

**Rechazo de injertos.** Los injertos de tejido y órganos, aunque son herramientas poderosas para tratar enfermedades y lesiones, provocan poderosas respuestas inmunitarias que pueden dar como resultado el rechazo rápido de injertos en ausencia de terapia inmunosupresora. Los estudios pioneros llevados a cabo en los 40 y los 50 establecían que el rechazo de aloinjertos se debía a respuestas inmunitarias, más tarde se ligaron a los linfocitos T. Los mecanismos inmunológicos efectores específicos responsables del rechazo de injertos incluyen las células T citotóxicas, la hipersensibilidad tipo retardada y los efectos dependientes de anticuerpo. Se han desarrollado varios anticuerpos terapéuticos que se dirigen al marcador celular T CD25 para el tratamiento del rechazo de trasplantes (por ejemplo, Zenapax™, Simulect™). Además, los anticuerpos de las clases IgG pueden estar implicadas en el rechazo de trasplantes (Jordan, S.C. y col., 2005, *Pediatric Transplantation*, 9, 408-415). La inhibición de FcRn puede por lo tanto utilizarse para disminuir los niveles de tales anticuerpos perjudiciales durante el trasplante.

**Enfermedad de Graves.** Marcada por nerviosismo y sobre-estimulación, la enfermedad de Graves es el resultado de una glándula tiroidea hiperactiva (hipertiroidismo) debido a la producción de anticuerpos autorreactivos que reconocen el receptor de la hormona tiroidea estimulante. Las hormonas tiroideas regulan el metabolismo y la temperatura corporal, y son esenciales para el crecimiento normal y la fertilidad. Pero en cantidades excesivas, pueden dar lugar al agotamiento que se ve en esta forma relativamente común de enfermedad tiroidea. No está claro los que desencadena este problema, pero está implicado el sistema inmunitario. En los pacientes con enfermedad de Graves, se encuentran anticuerpos diseñados específicamente para estimular la tiroides

En muchos casos, los fármacos que reducen la producción tiroidea son suficientes para controlar esta afección. Un tratamiento corto con yodo radioactivo, que reduce drásticamente la actividad de la tiroides, es otra opción para las personas que han pasado la niñez. En algunos casos, es necesaria la cirugía para retirar toda o parte de la tiroides (tiroidectomía). La cirugía puede también aliviar algunos síntomas de la enfermedad de Graves. Los ojos prominentes, por ejemplo, se pueden corregir creando un espacio extra suficiente en las cavidades de los senos cercanas para permitir al ojo asentarse en una posición más normal.

**Miastenia gravis.** El número de pacientes con miastenia gravis en los Estados Unidos, se estima solamente en el 0,014% de la población, o aproximadamente 36.000 casos; sin embargo la miastenia gravis está probablemente bajo diagnosticada. La miastenia gravis está causada por anticuerpos autorreactivos que reconocen el receptor de acetilcolina. Previamente, las mujeres parecían que se afectaban más a menudo que los hombres, con una edad más común de aparición entre la segunda y tercera década en las mujeres, y la séptima y octava en los hombres. Como las edades de la población. La edad media de aparición se ha incrementado en correspondencia, y ahora los hombres se afectan más a menudo que las mujeres, y la aparición de los síntomas es usualmente tras la edad de 50 años.

En la miastenia gravis adquirida, las membranas musculares post-sinápticas están deformadas y simplificadas, habiendo perdido su forma normal plegada. La concentración de receptores de ACh en la membrana de la placa final muscular se reducen, y los anticuerpos se unen a la membrana. La ACh se libera normalmente, pero su efecto en la membrana post-sináptica está reducido. La membrana post-unión es menos sensible a la aplicación de ACh, y la probabilidad de que un impulso nervioso produzca un potencial de acción muscular se reduce.

**Cáncer.** El uso de anticuerpos modificados para dirigirse a cánceres es un área de rápida expansión (Hudson y Souriau, 2003). Se han aprobado por la FDA hasta la fecha múltiples anticuerpos para el tratamiento de varios cánceres, por ejemplo para el linfoma no Hodgkin (anti-CD20; Rituxan™, Zevalin™), cáncer de mama metastático (anti-Her-2; Herceptin™), leucemia mieloide aguda (anti-CD33; Mylotarg™), leucemia linfocítica crónica (anti-CD52; Campath™) y cáncer de colon (anti-VEGF: Avastin™). Tales anticuerpos se beneficiarían de tener un aumento de la persistencia *in vivo*, que resultaría en la necesidad de dosis más bajas e intervalos menos frecuentes.

El diagnóstico por imagen de tumores con anticuerpos radiomarcados también está llegando a ser paulatinamente algo común. La posibilidad de inducir el rápido aclaramiento del agente de imagen del cuerpo a continuación del diagnóstico por imagen sería atractivo lo que resultaría en una carga radioactiva reducida.

## 11. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen las técnicas representativas descubiertas por los inventores para funcionar Bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se pueden considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se han desvelado y aún obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será aparente que ciertos agentes que estén química y fisiológicamente relacionados se pueden sustituir por los agentes descritos en el presente documento mientras que se consigan los mismos resultados o similares. Todos tales sustitutos similares y modificaciones aparentes para los expertos en la técnica están tácitamente en el espíritu, alcance y concepto de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### 15 EJEMPLO 1: Materiales y métodos

**Mutagénesis dirigida al sitio.** Se mutaron las regiones constantes de IgG1 humana utilizando la PCR con oligonucleótidos mutagénicos y corte y empalme por extensión de solapamiento (Horton y col., 1989). Los sitios de restricción que engloban la secuencia mutada en el gen de la región constante se utilizaron para reclonar las regiones mutadas como subfragmentos más pequeños del gen de la región constante completo. A continuación del reclonado, los genes de la región constante se secuenciaron para asegurar la inserción de la mutación deseada sin mutaciones de un segundo sitio. Los genes mutados se reclonaron en la construcción de expresión final (FIG. 2) utilizando métodos de referencia de biología molecular.

**Transfección para la expresión de anticuerpos.** Las células NSO que expresan una cadena ligera específica anti-lisozima humana (HuLys5: Foote y Winter, 1992) se transfectaron por electroporación con construcciones de expresión de cadena pesada (FIG. 2) que codifican una cadena pesada anti-lisozima con mutaciones en la región Fc como se ha descrito. Los transfectantes se seleccionaron en un medio que contenía ácido micofenólico/xantina (como en Foote y Winter, 1992) y se exploraron los sobrenadantes en cuanto a la expresión de anticuerpos por ELISA. Los clones positivos se expandieron más para la producción de proteínas.

**Expresión, purificación y marcado de IgG.** Se purificaron las IgG humanas recombinantes (variantes de tipo silvestre y mutadas; todas específicas de la lisozima) de los sobrenadantes de los cultivos utilizando lisozima-Sepharosa como se describe en Foote y Winter (1992). Se radiomarcó la IgG1 humana con Iodogen como se describe en Kim y col (1994a).

**Expresión y purificación de FcRn recombinante.** Se expresó el FcRn humano soluble recombinante en células High-Five (Invitrogen) infectadas con baculovirus recombinantes y se purificó la proteína utilizando  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarosa seguida por HPLC utilizando una columna de grado 200 prep Superdex™ HiLoad 26/60 (Pharmacia) como se ha descrito (Zhou y col., 2003).

**Análisis de resonancia de plasmones superficiales.** Se llevó a cabo la unión del FcRn humano a IgG inmovilizadas como se había descrito anteriormente (Zhou y col., 2005). El FcRn se une en dos sitios de la IgG que no son equivalentes (Zhou y col., 2005). Los datos se ajustaron por tanto a un modelo de dos sitios implicando dos sitios de unión independientes. Esto generó estimaciones de dos constantes de disociación ( $K_{D1}$  y  $K_{D2}$ ), que se toman para representar la ocupación del primer sitio en la IgG ( $K_{D1}$ ) seguida por la ocupación del segundo sitio con afinidad más baja ( $K_{D2}$ ).

**Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas.** Para determinar los niveles de IgG total en el suero en ratones Swiss, se utilizaron ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron placas de 96 pocillos con IgG de conejo anti-ratón (específica de cadena pesada; Zymed) y luego se bloquearon los sitios no específicos con un 2% de seroalbúmina bovina en PBS. Se hicieron diluciones de las muestras de suero en PBS y entonces se añadieron a los pocillos. Las IgG de ratón unidas se detectaron utilizando IgG de conejo anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano rústico (específica de cadena ligera y pesada; Zymed). Se generó una curva de referencia utilizando IgG de ratón purificadas (The Binding Site, R. U.).

**Análisis de los efectos de moléculas de IgG1 humanas mutadas sobre los niveles de IgG en ratones.** Efectos de la IgG1 humana radiomarcada sobre el aclaramiento: Se inyectaron intravenosamente los ratones Swiss con IgG1 humana de tipo silvestre marcada con  $^{125}\text{I}$  y se utilizó un recuento de cuerpo completo (AtomLab 100 Dose Calibrator) para evaluar los niveles de IgG1 radiomarcada. Tres días más tarde, se inyectó a los ratones por vía intravenosa 500  $\mu\text{g}$  de o bien IgG1 humana de tipo silvestre o bien 500  $\mu\text{g}$  o 200  $\mu\text{g}$  de IgG1 humana mutada que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436. Se determinaron los niveles de IgG1 humana radiomarcada en los tiempos indicados en la FIG. 4 utilizando un recuento de cuerpo completo (AtomLab 100 Dose Calibrator). Efectos sobre los niveles de IgG de ratón endógena: Se determinaron los niveles de IgG de ratón séricas por ELISA de muestras disueltas en suero. Se inyectaron intravenosamente los ratones con 500  $\mu\text{g}$  de IgG1 humana de tipo silvestre o 500  $\mu\text{g}$  de IgG1 humana mutada que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr

436. Se determinaron los niveles de IgG endógena (de ratón) por ELISA en los tiempos indicados en la FIG. 5 después de la inyección.

## EJEMPLO 2: Resultados

5 El análisis de las interacciones del FcRn humano con la IgG1 humana de tipo silvestre y las IgG1 humanas mutantes que contenían Lys 433, Phe 434 y His 436 (mutadas respecto al correspondiente resto de IgG1 de ratón en la posición 436) o Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 (resto de tipo silvestre en la posición 436) indica que la mutante con el Tyr 436 de tipo silvestre tiene una afinidad de aproximadamente dos veces más alta que el mutante que contenía His 436 (Tabla I). Además, ambos mutantes tienen afinidades sustancialmente más altas para el FcRn humano que la IgG1 humana de tipo silvestre correspondiente. Estas afinidades están mejoradas además cuando se añaden las mutaciones de Met 252 en Tyr, Ser 254 en Thr y Thr 256 en Glu a las mutaciones en las posiciones 433, 434 (y 436). La afinidad más alta de unión por el FcRn humano se mantiene en la variante de IgG1 humana que contiene el resto Tyr de tipo silvestre, más que con histidina, en la posición 436 (Tabla II). En conjunto, los datos indican por tanto que se prefiere la Tyr436 sobre la His436 para la interacción de la IgG1 humana con el FcRn humano.

También se han analizado las dependencias del pH de las interacciones de las variantes de IgG1 humana de tipo silvestre y la IgG1 humana mutada con Lys 433, Phe 434 y Tyr 436, o Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 con el FcRn humano y de ratón (FIG. 3A-F). Los datos mostrados en las FIG. 3A, 3B y 3F indican que la adición de Tyr 252, Thr 254 y Glu 256 a la IgG1 humana que contiene Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 reduce la dependencia del pH de la interacción con el FcRn humano (se observan resultados similares en la unión al FcRn de ratón: datos no mostrados). La comparación de las FIG. 3A y 3C también indica que la interacción de la IgG1 humana mutante que contiene Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 con el FcRn de ratón es menos dependiente del pH que la interacción correspondiente con el FcRn humano.

Los análisis de unión por lo tanto muestran que las IgG1 humanas mutantes que contienen Lys 433, Phe 434 y Tyr 436, o Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 tienen una mayor afinidad de unión para el FcRn con respecto a la IgG1 humana de tipo silvestre. Además, la dependencia del pH de la IgG1 humana que contiene Tyr 252, Thr 254 y Glu 256 para la unión al FcRn está reducida con respecto a las IgG1 (mutantes) que contienen los restos de la IgG1 humana de tipo silvestre en las posiciones 252, 254 y 256.

Se ha analizado la capacidad de la IgG1 humana mutante que contiene Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 para aumentar las tasas de aclaramiento de IgG en ratones. Se investigó inyectando primero a los ratones con IgG1 humana de tipo silvestre radiomarcada ( $^{125}$ I), y tres días más tarde se inyectaron los ratones con diferentes dosis de IgG1 humana mutante que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 o IgG1 humana tipo silvestre. La FIG. 4 muestra los niveles de radioactividad que permanecen en el ratón a diferentes tiempos durante el experimento. Estos niveles se evaluaron utilizando un recuento corporal y por lo tanto indican los niveles de IgG1 marcadas en el cuerpo entero, más que en el suero. Después de la inyección de 500  $\mu$ g de IgG1 humana mutante se observó una rápida caída de los niveles de IgG1 en el ratón. De manera similar, pero con un efecto menos marcado, se observó en los ratones tratados con 200  $\mu$ g de IgG1 humana mutante (FIG. 4). Por el contrario, en el tratamiento de los ratones con 500  $\mu$ g de IgG1 humana de tipo silvestre no se observó ningún efecto sobre el aclaramiento de la IgG1 radiomarcada.

El inventor analizó después si la inyección de IgG1 humana mutante que contenía Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 daba como resultado una disminución de las IgG endógenas en el suero de los ratones. Se determinaron los niveles séricos de IgG (estado constante) y posteriormente se inyectaron los ratones con o bien 500  $\mu$ g de IgG1 humana mutante o bien IgG1 humana de tipo silvestre. Con respecto al tratamiento de ratones con IgG1 humana de tipo silvestre, el tratamiento con la IgG1 humana mutante resultaba en disminuciones significativas de los niveles de IgG séricas endógenas que persistían durante aproximadamente 4 días (FIG. 5).

En conjunto, los datos que se muestran en las FIG. 4-5 indican que la IgG1 humana mutante que contiene Tyr 252, Thr 254, Glu 256, Lys 433, Phe 434 y Tyr 436 puede reducir los niveles exógenos y endógenos de IgG en ratones. Además, como el inventor ha analizado los efectos *in vivo* de la IgG1 mutante sobre los niveles de IgG tanto en el compartimento del suero como en el cuerpo entero, sus observaciones sugieren que la inhibición de la función del FcRn actúa en diversos sitios por todo el cuerpo.

**Tabla II: Afinidades de unión de las Variantes de IgG1 humana con el FcRn humano**

	$K_D1$ ( $\mu$ M) <sup>1</sup>	$K_D2$ ( $\mu$ M) <sup>1</sup>
IgG1 humana tipo silvestre	0,37	2,1
H433K/N434F <sup>2</sup>	0,057	0,66
H433K/N434F/Y436H	0,139	1,7
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F <sup>2</sup>	0,012	0,35
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H	0,024	0,54

<sup>1</sup> – Hay dos sitios de unión no equivalentes en la IgG para el FcRn humano. Los datos por lo tanto se analizaron utilizando un modelo de unión de dos sitios. Se determinaron las afinidades de las interacciones del FcRn humano con IgG inmovilizadas como en Zhou y col. (2003; 2005), pero utilizando un modelo que implica dos sitios de unión independientes.

<sup>2</sup> – Estos mutantes tienen un resto tirosina del tipo silvestre en la posición 436. Nomenclatura: H433K = His 433 en Lys, etc.

### EJEMPLO 3: Métodos y Resultados

5 **Marcado de anticuerpos.** Los anticuerpos se marcaron utilizando Iodogen o se biotinizaron en tampón carbonato 0,1 M (pH 8,5) utilizando 9 µg de EZ-link Sulfo-NHS biotin (Pierce) por miligramo de anticuerpo como se había descrito (Firan y col., 2001). Antes de su uso en los estudios, todos los anticuerpos marcados se compararon con sus equivalentes sin marcar utilizando resonancia de plasmones superficiales para asegurar que el marcado no había alterado sus características de unión.

10 **Ensayos de transporte placentario.** Se utilizaron esencialmente los mismos métodos que los que se habían descrito anteriormente (Firan y col., 2001). Se añadieron tres mg de cada una de IgG1 humana de tipo silvestre o IgG1 humana mutante que contenía Lys 433 y Phe 434 con el resto Tyr de tipo silvestre en la posición 436 (marcada con o biotina o <sup>125</sup>I) al compartimento materno del modelo placentario *ex vivo* y se analizó el transporte al compartimento fetal por recolección de muestras a los tiempos indicados. A continuación de la recolección, se  
15 centrifugaron las muestras a 1500 g durante 10 minutos y se desecharon los aglomerados. Se determinaron las cantidades de IgG en el sobrenadante por ELISA (para la IgG biotinilada) o por recuento  $\gamma$  tras la precipitación con TCA al 10%.

20 **Resultados.** La FIG. 6 muestra que el derivado mutante de la IgG1 humana, HN (His433→Lys, Asn434→Phe) se transporta mejor a través de la placenta humana que la IgG1 humana de tipo silvestre.

### Referencias

25 Las referencias enumeradas a continuación suplementan, explican, proporcionan antecedentes para, o enseñan la metodología, técnicas, y/o composiciones que se emplean en el presente documento.

- Patente de EE. UU. 4.843.092  
Patente de EE. UU. 6.277.375  
Antohe y col., Human Immunol., 62:93-105, 2001.
- 30 Arend y Dayer, Arthritis Rheum., 38:151-160, 1995.  
Bitonti y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 101:9763-9768, 2004.  
Burmeister y col., Nature, 336-343, 1994b.  
Dall'Acqua y col., J. Immunol., 169:5171-5180, 2002.
- 35 Dickinson y col., J. Clin. Invest., 104, 903-911, 1999.  
Dinarelli, Int. Rev. Immunol., 16:457-499, 1998.  
Edelman y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 63:78-85, 1969.  
Firan y col., Int. Immunol., 13(8):993-1002, 2001.  
Foote y Winter, J. Mol. Biol., 224:487-499, 1992.
- 40 Ghetie y Ward, Annu. Ref. Immunol., 18:739, 2000.  
Ghetie y col., Eur. J. Immunol., 26(3):690-696, 1996.  
Ghetie y col., Immunol Today, 18(12):592-598, 1997.  
Hinton y col., J. Biol. Chem., 279:6213-6216, 2004.  
Horton y col., Gene, 77:61-68, 1989.
- 45 Hudson y Souriau, Nat. Med., 9:129-134, 2003.  
Israel y col., Immunol., 89:573-578, 1996.  
Israel y col., J. Immunol., 154:6246-6251, 1995.  
Junghans y Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 93(11):5512-5516, 1996.
- 50 Kabat y col., En: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991.  
Kacsokovics y col., J. Immunol., 164:1889-1897, 2000.  
Kim y col., Eur. J. Immunol., 24:2429-2434, 1994a.  
Kim y col., Eur. J. Immunol., 24:542-548, 1994b.  
Kim y col., Scand. J. Immunol., 40:457-465, 1994c.  
Kim y col., Eur. J. Immunol., 29:2819-2825, 1999.
- 55 Kobayashi y col., Am. J. Physiol. Renal Physiol., 282, F358-F365, 2002.  
Kotzin y O'Dell, En: Samler's Immunologic Diseases, 5th Ed., Frank y col. (Eds.), Little Brown & Co., Boston, 667-697, 1995.  
Kotzin, Cell, 85:303-306, 1996.

- Kristoffersen y Matre, *Eur. J. Immunol.*, 26(7):1668-1671, 1996.  
 Leach y col., *J. Immunol.*, 157:3317-3322, 1996.  
 Lipsky, En: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci y col. (Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- 5 Martin y col., *Mol. Cell*, 7:867-877, 2001.  
 Martin y col., *Molecular Cell*, 7:867-877, 2001.  
 McCarthy y col., *J. Cell Sci.*, 113:1277-1285, 2000.  
 Medesan y col., *Eur. J. Immunol.*, 26:2533-2536, 1996.  
 Medesan y col., *J. Immunol.*, 158(5):2211-2217, 1997.
- 10 Ober y col., *Int. Immunol.*, 13:1551-1559, 2001.  
 Ober y col., *J. Immunol.*, 172:2021-2029, 2004.  
 Ober y col., *J. Immunol.*, 172(4):2021-2029, 2004.  
 Ober y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 101(30):11076-11081, 2004.  
 Ober y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU.*, 101:11076-11081, 2004.
- 15 Ohnishi y col., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 9:1747-1750, 1994.  
 Popov y col., *Mol. Immunol.*, 33:521, 1996.  
 Raghavan y col., *Biochemistry*, 34:14649, 1995.  
 Roberts y col., *J. Cell Biol.*, 111:1867-1876, 1990.  
 Rodewald y Kraehenbuhl, *J. Cell Biol.*, 99:S159-S164, 1984.
- 20 Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604, 2001.  
 Simister y col., *Eur. J. Immunol.*, 26(7):1527-1531, 1996.  
 Simister, *Vaccine*, 21:3365-3369, 2003.  
 Spiekermann y col., *J. Exp. Med.*, 196(3):303-310, 2002.  
 Story y col., *J. Exp. Med.*, 180:2377-2381, 1994.
- 25 Tsao y Hahn, *Int Rev Immunol.*, 11(4):305-320, 1994.  
 Vaccaro y col., *Nat. Biotech.*, 23, 1283-1288, 2005.  
 van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7-16, 2001.  
 Vilcek y Feldmann, *Trends in Pharmacological Sciences*, 25:201-209, 2004.
- 30 Wallace y Rees, *Biochem. J.*, 188:9-16, 1980.  
 Yoshida y col., *Immunity*, 20:769-783, 2004.  
 Zhou y col., *J. Mol. Biol.*, 332:901-913, 2003.  
 Zhou y col., *J. Mol. Biol.*, 345, 1071-1081, 2005.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de IgG1 que comprende un dominio Fc, un dominio CH3 o bisagra Fc derivada de la IgG1 humana que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436, en donde la molécula de IgG1 es una Ig bivalente, una cadena sencilla de Ig, o una molécula de cadena pesada de IgG1 tal como una cadena pesada de longitud completa.
- 10 2. La molécula de IgG1 de la reivindicación 1, comprendiendo además la molécula uno o más de Tyr 252, Thr 254 y Glu 256, la molécula comprende preferentemente además Tyr 252, Thr 254, o Glu 256; la molécula más preferentemente comprende además Tyr 252 y Thr 254, Tyr 252 y Glu 256, o Thr 254 y Glu 256; la molécula más preferentemente comprende además Tyr 252, Thr 254 y Glu 256.
- 15 3. Un fragmento de la molécula de IgG de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento es el dominio Fc de una IgG1 humana que comprende Lys 433, Phe 434 y Tyr 436.
- 20 4. La molécula de IgG de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de IgG1 se une a un agente patógeno tal como un virus, bacteria, parásito u hongo; o en donde dicha molécula de IgG1 se une a una toxina, un anticuerpo autoinmune, o un anticuerpo anti-trasplante.
5. Una composición farmacéutica que comprende una molécula IgG1 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el fragmento de la reivindicación 3 y un tampón, vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha molécula de IgG1 o fragmento es terapéutico o profiláctico para un trastorno autoinmune o infección por un agente patógeno.
- 25 7. La molécula de IgG1 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el fragmento de la reivindicación 3 para su uso en
- 30 (a) el aumento de las tasas de aclaramiento en un sujeto que padece de anticuerpos patógenos o que se trata con un anticuerpo para aclarar un fármaco tóxico del cuerpo; o
- (b) el bloqueo de la función de FcRn en un sujeto que padece de autoinmunidad o que está expuesto a una transferencia de anticuerpos patógenos de la madre al hijo.
8. La molécula de IgG1 de la reivindicación 1 que se conjuga con un agente terapéutico o diagnóstico.
- 35 9. La molécula de IgG1 de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho agente terapéutico es un antibacteriano, antivírico o antitoxina, o en donde dicho agente diagnóstico es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, o un cromóforo.
- 40 10. Una proteína quimérica que comprende una molécula de IgG1 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el fragmento de la reivindicación 3.
11. La molécula de IgG1 de la reivindicación 1 para su uso como un medicamento, en donde la molécula de IgG1 se suministra por medio de un epitelio que expresa FcRn.
- 45 12. La molécula de IgG1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el epitelio es epitelio intestinal, bronquial o pulmonar.

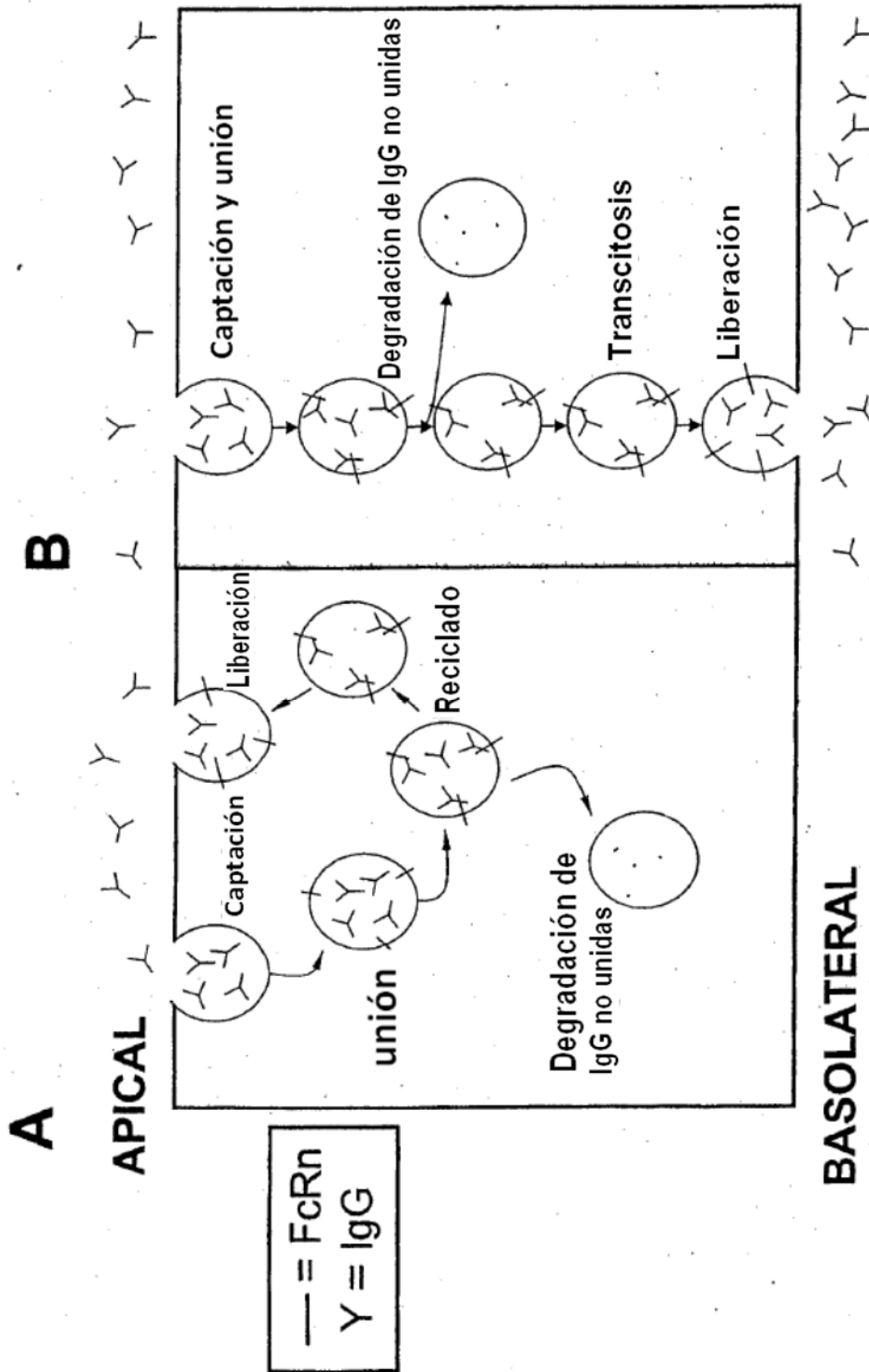


FIG. 1A-B

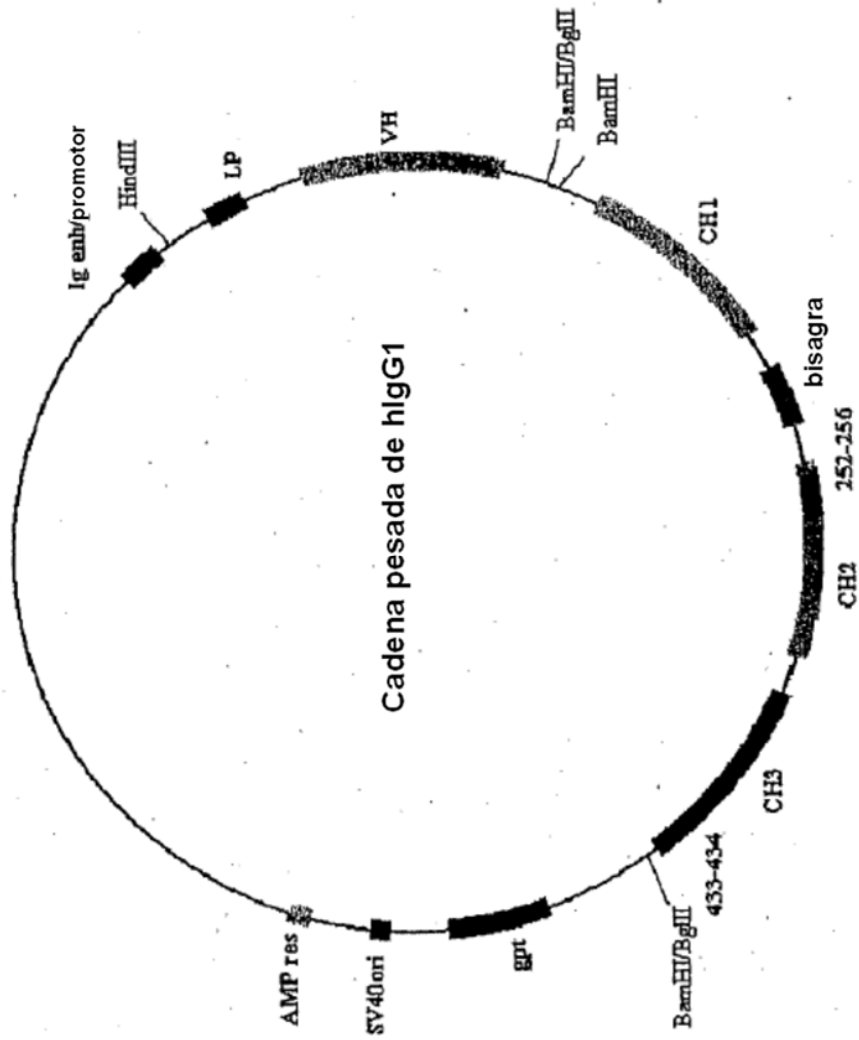


FIG. 2

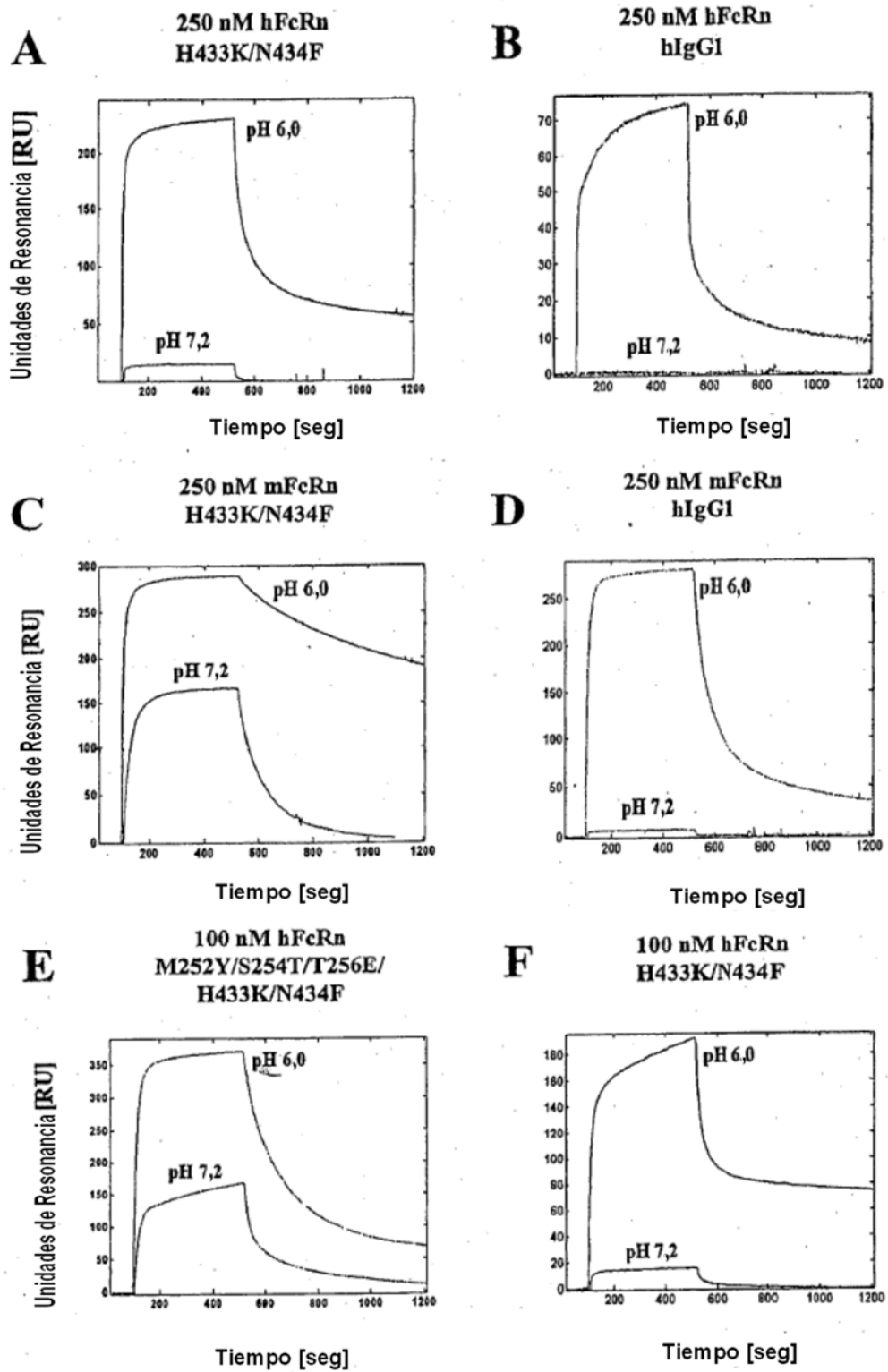


FIG. 3A-F

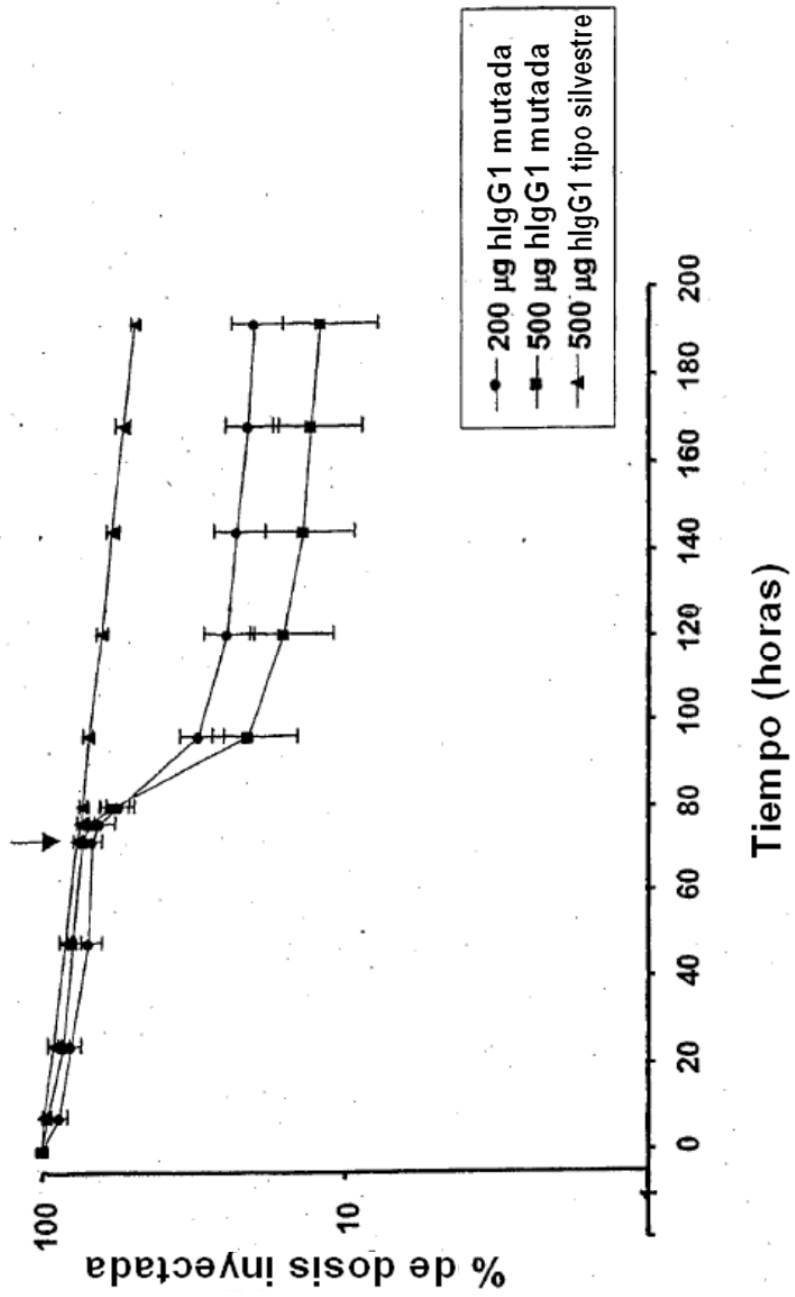


FIG. 4

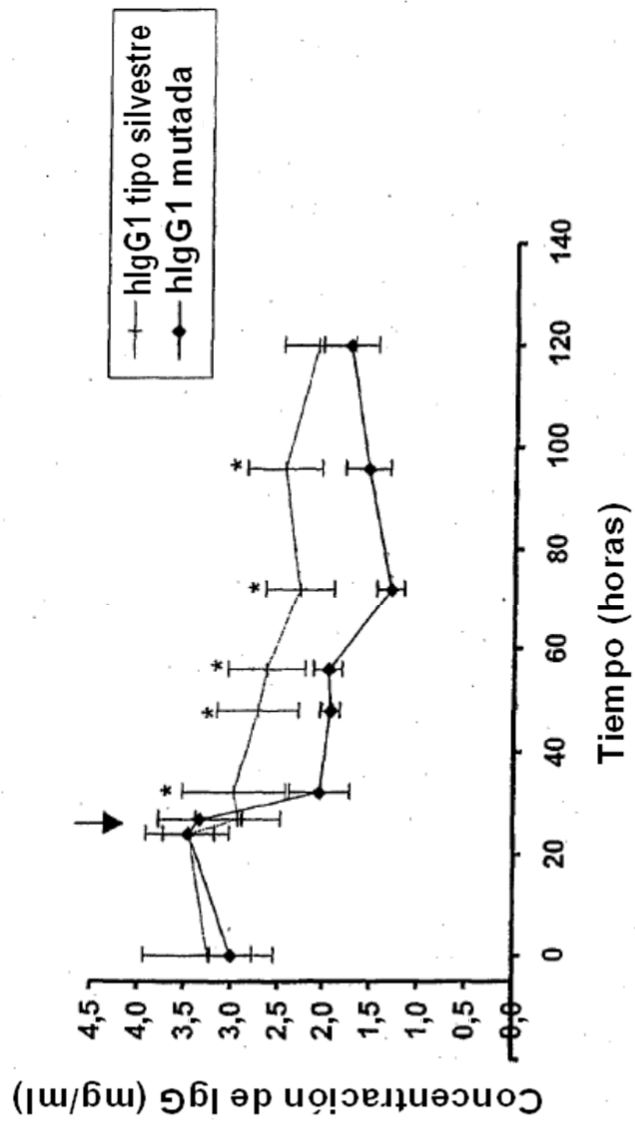


FIG. 5

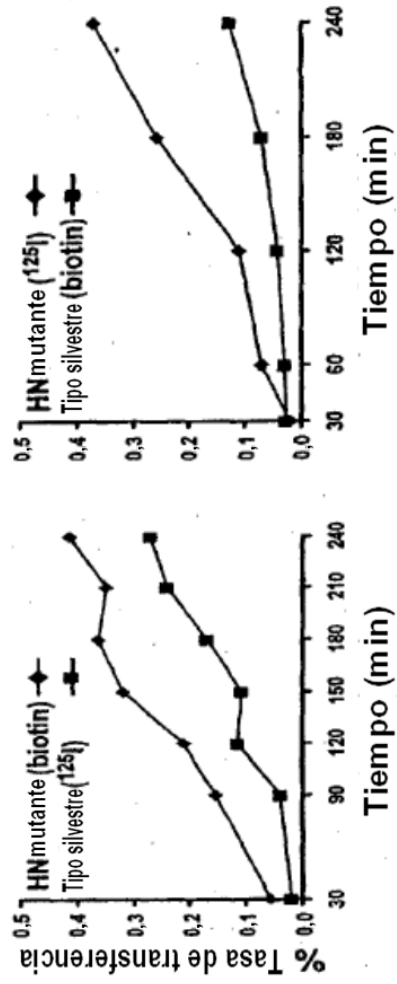


FIG. 6