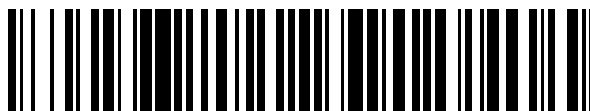


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 571**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2011 PCT/GB2011/051563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022982**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11763754 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2606063**

54 Título: **Anticuerpos mejorados de la clase IgG4**

30 Prioridad:

20.08.2010 GB 201014033

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

14.09.2017

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

HUMPHREYS, DAVID PAUL;

ADAMS, RALPH;

HEADS, JAMES y

PETERS, SHIRLEY JANE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 632 571 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 mejorados de la clase IgG4

La presente invención se refiere a un anticuerpo mejorado que tiene una disposición alterada de enlaces disulfuro en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje y un método para producir el anticuerpo mejorado.

5 La industria biofarmacéutica que abarca proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales (mAbs) y fármacos basados en ácidos nucleicos está creciendo rápidamente. La ingeniería de anticuerpos ha dado como resultado el diseño y la producción de fragmentos de anticuerpos o formatos alternativos. El formato molecular preferido junto con otros aspectos tales como el rendimiento de producción, la calidad de la proteína y la estabilidad al almacenamiento se tienen en cuenta al seleccionar una proteína a base de anticuerpo como agente terapéutico.

10 La estructura básica de todas las moléculas de inmunoglobulina (Ig) comprende dos cadenas pesadas idénticas (HCs) y dos cadenas ligeras idénticas (LCs) que están acopladas por enlaces disulfuro. Cada LC consiste en un dominio variable (VL) y uno constante (CL). Sobre la base del HC, se reconocen cinco clases principales de Ig: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. Para IgG, el HC consiste en un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (C_H1-3). Los dominios CH2 y CH3 forman la parte Fc de la molécula que es responsable de estimular la función efectora y está
15 unida al fragmento Fab (VHVL y CHCL) por una región bisagra que confiere flexibilidad a la molécula IgG. Dos sitios de reconocimiento de antígenos están situados en los extremos de los dominios VL y VH. La IgG se subdivide además en 4 isotipos diferentes: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

20 Las funciones efectoras mediadas por Fc, es decir, la citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) dependen del isotipo. Cada isotipo ha evolucionado para realizar una función específica dentro del cuerpo. El isotipo IgG1 es actualmente el más ampliamente utilizado como agente terapéutico debido a su semivida prolongada, activación ADCC mejorada y activación del complemento. Otros isotipos se consideran agentes terapéuticos dependientes del objetivo y del efecto deseado. Por ejemplo, cuando los antígenos diana están simplemente neutralizados y las funciones efectoras son menos importantes, se pueden usar isotipos alternativos tales como IgG2 e IgG4. Alternativamente, se puede considerar IgG con Fc re-
25 modificado/función efectora.

La IgG2 también tiene una función efectora asociada mínima pero es propensa a la dimerización, lo que no se entiende completamente. IgG4 sigue siendo un isotipo útil debido a su relativa falta de inducción de la función efectora. Sin embargo, IgG4 también tiene algunas dificultades prácticas inherentes, a saber, su propensión a formar medio anticuerpo, su capacidad de intercambio de semi-moléculas y su menor vida media en suero.

30 In vitro, las moléculas de IgG4 se ajustan a la estructura prototípica de IgG, pero in vivo se ha observado que forman semi-moléculas que comprenden una única cadena ligera y una cadena pesada única causada por la formación de enlaces disulfuro de cadena pesada intra dentro de la bisagra. Se ha observado que un gran porcentaje de IgG4 circulante es biespecífico, pero funcionalmente monovalente. Esto se debe a que la mitad de la molécula puede formar IgG4 con otras semi- moléculas de IgG4 (Schuurman, J., Van Ree, R., Perdok, G.J., Van Doorn, H.R., Tan, K.Y., Aalberse, R.C., 1999. La inmunoglobulina G4 humana normal es biespecífica: tiene dos sitios diferentes que combinan el antígeno. *Immunology* 97, 693-698).
35

La formación de medias moléculas de IgG4 puede reducirse mediante la introducción de una mutación Ser a Pro en la posición 241 (numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) en la bisagra (Angal, S. et al., 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol Immunol* 30, 105-108). Además, esta mutación de punto no influyó en la estructura compacta de IgG4 permitiendo de este modo que IgG4 conservara su capacidad reducida de activar el complemento. Lu Yanling et al, "The Effect of a Point Mutation on the Stability of IgG4 as Monitored by Analytical Centrifugation"; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 97, No. 2, February 2008, páginas 960-969 describe el efecto de la estabilidad de una mutación (residuo de serina 241 a prolina) a un anticuerpo IgG4.
40

45 Después del descubrimiento de la mutación S241P, se han investigado otras mutaciones a IgG4 para comprender la interacción de la cadena inter-pesada en anticuerpos IgG4, reducir la función efectora de IgG4 y mejorar la estabilidad estructural. En Schuurman et al. (Schuurman, J et al., 2001. The inter-heavy chain disulphide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulphide bonds. *Molecular Immunology* 38, 1-8), la inestabilidad observada de enlaces disulfuro de cadena inter-pesada de IgG4 se investigó usando mutantes de IgG4. En el mutante MI Cys 131 (numerado de acuerdo con el sistema de numeración de la UE o Cys 127 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat), que está implicado en el enlace disulfuro (C_L-C_{H1}) de la cadena ligera inter-pesada, se sustituyó por serina y se encontró que este mutante dio como resultado la formación de dímeros de cadenas ligeras y dímeros de cadenas pesadas. En el mutante M2, la cisteína 226 (226 numerada según el sistema de numeración de la UE o 239 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat), que está implicada en un enlace disulfuro de cadena inter-
50 pesada en la bisagra, fue sustituida por serina y se encontró que este mutante tenía un enlace inter-cadena pesada más estable en comparación con IgG4 y previene la formación de un enlace disulfuro de la cadena intra-pesada.
55

También se han investigado las mutaciones en los dominios CH₂ y CH₃ de anticuerpos IgG4 con el fin de reducir la formación de agregados de anticuerpos IgG4. El documento de EE.UU. 2008/0063635 de Takahashi et al. ha

5 investigado un mutante de IgG4 en el que la arginina en la posición 409 (409 numerada de acuerdo con el sistema de numeración EU o 440 numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) en el dominio CH3 se sustituye con lisina, treonina, metionina o leucina para inhibir la formación de agregados a pH bajo. Otras mutaciones en L235, D265, D270, K322, P329 y P331 (L235, D265, D270, K322, P329 y P331 numeradas de acuerdo con el sistema de numeración UE o L248, D278, D283, K341, P348 y P350 numeradas de acuerdo con la numeración Kabat) también se enseñan con el fin de atenuar la actividad de los CDC. El documento WO2008/145142, de Van de Winkel et al., describe anticuerpos IgG4 estables que tienen una capacidad reducida de experimentar intercambio del brazo Fab por sustitución del residuo de arginina en la posición 409, el residuo Phe en la posición 405 o el Lys en la posición 370 (R409, F405 y K370 numerados de acuerdo con el sistema de numeración UE o R440, F436 y K393 numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) incluso en ausencia de la mutación de la S228P (S228 numerada según el sistema de numeración de la UE o S241 según el sistema de numeración Kabat) en la región bisagra.

15 La alteración del número de residuos de cisteína presentes en la región bisagra de los anticuerpos se ha investigado previamente. El documento de EE.UU. 5677425, de Bodmer et al., describe que el número de residuos de cisteína en la región bisagra puede aumentarse con el fin de facilitar el uso de los grupos tiol de cisteína para unir moléculas efectoras o indicadoras. El documento de EE.UU. 5677425 también enseña que el número de residuos de cisteína en la región bisagra puede reducirse a uno para facilitar el montaje de las moléculas de anticuerpo, ya que sólo será necesario formar un enlace disulfuro único, que proporcionará un objetivo específico para unir la región de bisagra ya sea a otra región de bisagra o a una molécula efectora o indicadora.

20 Sin embargo, todavía existe la necesidad de proporcionar nuevos anticuerpos que tengan propiedades mejoradas, que los haga aún más adecuados para su uso como agentes terapéuticos. La presente invención proporciona nuevos anticuerpos mutantes que tienen propiedades ventajosas que incluyen propiedades biofísicas mejoradas en comparación con anticuerpos de tipo salvaje. En particular se ha encontrado sorprendentemente que la modificación de la posición del residuo de cisteína en la cadena pesada de un anticuerpo IgG4 que forma un enlace disulfuro con una cisteína en la cadena ligera proporciona un anticuerpo IgG4 que tiene una estabilidad mejorada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_H1 y una región bisagra, en el que en cada cadena pesada:

- 30 a. la cisteína inter-cadena en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, en el dominio C_H1 se sustituye con otro aminoácido; y
- b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra superior está sustituido con cisteína.

La cisteína en el dominio C_H1 que forma un enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en una cadena ligera es la cisteína en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, se muestra en la figura 1b.

35 Al cambiar la posición del enlace disulfuro en la región constante de IgG4, se observa una T_m mayor para el dominio Fab. La temperatura a la que se despliega el 50% de la proteína se designa T_m. Experimentalmente, la T_m se determina como el punto de inflexión de, por ejemplo, la curva de fluorescencia frente a la temperatura (es decir, la temperatura en la que la curva de fluorescencia frente a la temperatura es la más pronunciada).

40 Por lo tanto, una T_m más alta infiere una mayor estabilidad térmica. De este modo, las moléculas de la presente descripción tienen una mayor estabilidad térmica.

Aunque no se desea estar limitado por la teoría, esto puede ser como resultado de la reducción de la deformación o de la tensión interna en el enlace disulfuro o en las moléculas polipeptídicas obtenidas.

También se pueden obtener mejoras adicionales en la estabilidad térmica mediante la introducción de modificaciones adicionales en la región constante de IgG4.

45 Los uno o más aminoácidos situados en la región de bisagra superior que están sustituidos con cisteína pueden seleccionarse entre 226, 227, 228, 229, 230, 237 y 238, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en la figura 1b (subrayado aminoácidos en la región bisagra superior).

50 En una realización preferida, uno o más aminoácidos situados en la región de bisagra superior que están sustituidos con cisteína son uno o más de los aminoácidos en posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229 y 230, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las figuras 1b y 2a. En esta última disposición, la formación del enlace disulfuro entre cadenas (cadena ligera-cadena pesada) está en una posición análoga al puente disulfuro que se encuentra en las regiones constantes de IgG1.

Los presentes inventores han establecido que las IgG1 tienen una estabilidad térmica mayor que las moléculas de IgG4 en los dominios Fab y Fc. Sin embargo, la presente descripción permite la provisión de una molécula de IgG4

sin función efectora de ADCC, pero con la estabilidad térmica y/u otras propiedades ventajosas del modo de una molécula de IgG1.

5 Parece haber tres aspectos generales que influyen en la estabilidad del dominio Fab en la molécula de IgG4 formada. El primero es la posición del puente disulfuro. El segundo es el entorno próximo al puente disulfuro, es decir la naturaleza de los residuos alrededor del enlace disulfuro y el tercero es la longitud de la región bisagra superior.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada con una bisagra superior, núcleo y bisagra inferior, y dicha bisagra superior y núcleo en la cadena pesada o cada cadena pesada en la misma es de 13 a 17, tal como 15 aminoácidos de longitud.

10 En una realización, el anticuerpo IgG4 tiene una bisagra superior y un núcleo de 15 aminoácidos de longitud.

En una realización, la bisagra superior y el núcleo comprenden los 12 aminoácidos naturales encontrados en una bisagra de IgG4 y otros tres aminoácidos, por ejemplo 3 residuos de alanina, o 3 residuos de glicina o una combinación de los mismos.

En una realización, la bisagra tiene una de las siguientes secuencias:

15 ESKYGPPAAACPSCP SEQ ID No: 72

ESKYGPPGGGCPSCP SEQ ID No: 73

ESKYGPPTHTCPSCP SEQ ID No: 74

ESKYGDKTHTCPSCP SEQ ID No: 75

EPSKYGPPAAACPSCP SEQ ID No: 76

20 EPSKYGPPGGGCPSCP SEQ ID No: 77

EPSKYGPPTHTCPSCP SEQ ID No: 78

EPSKYGDKTHTCPSCP SEQ ID No: 79

ESKSYGPPAAACPSCP SEQ ID No: 80

ESKSYGPPGGGCPSCP SEQ ID No: 81

25 ESKSYGPPTHTCPSCP SEQ ID No: 82

ESKSYGDKTHTCPSCP SEQ ID No: 83

ESKYGPPAAACPPCP SEQ ID No: 84

ESKYGPPGGGCPPCP SEQ ID No: 85

ESKYGPPTHTCPPCP SEQ ID No: 86

30 ESKYGDKTHTCPPCP SEQ ID No: 87

EPSKYGPPAAACPPCP SEQ ID No: 88

EPSKYGPPGGGCPPCP SEQ ID No: 89

EPSKYGPPTHTCPPCP SEQ ID No: 90

EPSKYGDKTHTCPPCP SEQ ID No: 91

35 ESKSYGPPAAACPPCP SEQ ID No: 92

ESKSYGPPGGGCPPCP SEQ ID No: 93

ESKSYGPPTHTCPPCP SEQ ID No: 94

ESKSYGDKTHTCPPCP SEQ ID No: 95

40 En una realización, la bisagra superior y el núcleo de la molécula de IgG4 de la descripción consiste en una bisagra de IgG1 natural, es decir, EPKSCDKTHTCPPC SEQ ID No: 96

o un derivado del mismo tal como:

EPKSCDKAAACPPCP SEQ ID No: 97

EPKSCDKGGGCPPCP SEQ ID No: 98

EPKSCDKTHTSPPCP SEQ ID No: 99

EPKSCDKTHTCPPSP SEQ ID No: 100

5 EPKSCDKTHTSPPSP SEQ ID No: 101

EPKSCDKAAASPPCP SEQ ID No: 102

EPKSCDKAAACPPSP SEQ ID No: 103

EPKSCDKAAASPPSP SEQ ID No: 104

EPKSCDKGGGSPPCP SEQ ID No: 105

10 EPKSCDKGGGCPPSP SEQ ID No: 106

EPKSCDKGGGSPPSP SEQ ID No: 107

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:

15 la cisteína inter-cadena en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, en el dominio C_{H1} se sustituye con otro aminoácido; y

y la bisagra en la cadena pesada o cada cadena pesada en la misma es de 15 aminoácidos de longitud.

Las bisagras adecuadas se describen anteriormente.

20 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:

a. la cisteína en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, está sustituida con otro aminoácido; y

b. la cisteína en la posición 239 o la cisteína en la posición 242, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, están sustituidas con otro aminoácido.

25 En una realización de acuerdo con el último aspecto de la invención, la molécula de IgG4 también contiene 22 aminoácidos en la bisagra, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

Los anticuerpos proporcionados por la presente invención muestran propiedades ventajosas en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. Se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos de la presente invención muestran una termoestabilidad mejorada en particular del dominio Fab frente a un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

30 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un anticuerpo de la clase IgG3 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:

a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y

35 b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra superior está sustituido con cisteína.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la clase IgM que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, en el que en cada cadena pesada:

a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y

40 b. uno o más de los aminoácidos situados en el dominio C_{H1} o dominio C_{H2} está sustituido con cisteína.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la clase IgD que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:

a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y

b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra están sustituidos con cisteína.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica los anticuerpos de la presente invención y una célula huésped que comprende el vector de expresión.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo como el definido anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En un aspecto de la descripción hay un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se ha definido anteriormente.

En una realización, el anticuerpo es para uso en el tratamiento de una enfermedad distinta del cáncer.

Breve descripción de las figuras

10 La figura 1a muestra las secuencias de C_H1 y bisagra humanas de IgG1 tipo silvestre de tipo salvaje e IgG4 salvaje, en las que los restos de bisagra están subrayados y la secuencia constante de cadena ligera kappa.

La figura 1b muestra:

la secuencia constante de cadena ligera kappa humana que indica la cisteína (subrayada) que forma el enlace disulfuro C_L-C_H1 entre cadenas;

15 los residuos C_H1 N-terminales de la cadena pesada IgG 1, 2, 3 y 4 humana y las secuencias de la región bisagra en las que se indica la posición cisteína (en bisagra superior para IgG1 y en C_H1 N-terminal para IgG2, 3 y 4) (subrayado) que forma el enlace disulfuro C_L-C_H1 entre cadenas;

20 los residuos de C_H1 de N-terminal de cadena pesada de IgD humana y parte de las secuencias de región de bisagra en las que se indica la posición de cisteína en la secuencia de C_H1 N-terminal (subrayada) que forma el enlace disulfuro de C_L-C_H1 entre cadenas;

el C_H1 de N-terminal de la cadena pesada de IgM humano, los residuos de C_H1 de C-terminal y los residuos de C_H2 de N-terminal seleccionados en los que se indica (subrayado) la posición de cisteína en el C_H1 N-terminal que forma el enlace disulfuro de C_L-C_H1 entre cadenas; y

25 los residuos en la bisagra superior de IgG3 e IgG4, la bisagra de IgD y en el C_H1 de C-terminal y C_H2 de IgM donde los residuos subrayados indican posiciones en las que uno o más residuos pueden estar sustituidos con cisteína en los anticuerpos de la presente invención.

La Figura 2a muestra el residuo de cisteína C_H1 (C127) que forma el enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en la cadena ligera y los residuos de bisagra superior y central de IgG1 tipo salvaje, IgG4 tipo salvaje y las posiciones en las que se han introducido mutaciones en los anticuerpos IgG4 de la presente invención.

30 La Figura 2b muestra el residuo de cisteína C_H1 (C127) que forma el enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en la cadena ligera y los residuos de bisagra de tipo salvaje IgG3 y las posiciones en las que uno o más residuos están sustituidos con cisteína en los anticuerpos IgG3 de la presente invención.

35 La Figura 2c muestra el residuo de cisteína C_H1 (C127) que forma el enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en la cadena ligera y los residuos C_H1 y C_H2 seleccionados de IgM tipo salvaje y las posiciones en las que uno o más residuos están sustituidos con cisteína en los anticuerpos de IgM de la presente invención.

La Figura 2d muestra el residuo de cisteína C_H1 (C128) que forma el enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en la cadena ligera y los residuos bisagra de IgD tipo salvaje y las posiciones en las que uno o más residuos están sustituidos con cisteína en los anticuerpos IgD de la presente invención.

La Figura 3a muestra las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

40 La Figura 3b muestra las posiciones de los residuos en la cadena pesada mutada de los anticuerpos IgG4 mostrados en la Figura 3a y el enlace disulfuro predicho que puede formarse con una cisteína en la cadena ligera (LC) o con otra cadena pesada mutada (HC). Cuando la cisteína puede unirse con una cisteína en la LC o HC, la cadena subrayada es la disposición de enlace disulfuro predominante predicha.

La Figura 4a muestra las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

45 La Figura 4b muestra las posiciones de los residuos de cisteína en los anticuerpos IgG4 mostrados en la Figura 4a y el enlace disulfuro predicho que puede formarse con una cisteína en la cadena ligera (LC) o en la cadena pesada (HC). Cuando la cisteína puede unirse con una cisteína en la LC o HC, la cadena subrayada es la disposición de enlace disulfuro predominante predicha.

50 La Figura 5 muestra las secuencias del C_H1 y la región bisagra de los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

- La Figura 6 muestra las secuencias de C_H1, región bisagra, C_H2 y C_H3 de anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.
- La Figura 7 muestra el análisis Western Blot de anticuerpos de acuerdo con la presente invención con el gel superior mostrando los resultados usando un anticuerpo Fc anti-humano y el gel inferior mostrando los resultados usando un anticuerpo anti-Kappa.
- La Figura 8 muestra el análisis Western Blot de anticuerpos de acuerdo con la presente invención con el gel superior mostrando los resultados usando un anticuerpo Fc antihumano y el gel inferior mostrando los resultados usando un anticuerpo kappa anti- humano.
- La Figura 9 muestra el análisis Western Blot de anticuerpos de acuerdo con la presente invención con el gel superior mostrando los resultados utilizando un anticuerpo Fc antihumano y el gel inferior mostrando los resultados usando un anticuerpo kappa antihumano.
- La Figura 10 muestra el análisis Western Blot de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con el gel superior mostrando los resultados utilizando un anticuerpo Fc antihumano y el gel inferior mostrando los resultados usando un anticuerpo kappa antihumano.
- La Figura 11 muestra los resultados de un análisis de Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de dominio Fab y C_H2.
- La Figura 12 muestra los resultados de un análisis de Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de dominio Fab y C_H2.
- La Figura 13 muestra los resultados de un análisis de Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de dominio Fab y C_H2.
- La Figura 14 muestra los resultados de un análisis de Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de dominio Fab y C_H2.
- La Figura 15 muestra la clasificación de las termoestabilidades de anticuerpos seleccionados de la presente invención.
- La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo de afinidad para anticuerpos seleccionados de la presente invención y anticuerpos de control.
- La Figura 17 muestra los resultados de un análisis HPLC de anticuerpos seleccionados de la presente invención.
- La Figura 18 muestra un análisis Western Blot de anticuerpos según la presente invención con diferentes enlazadores.
- La Figura 19 muestra un análisis Western Blot de anticuerpos según la presente invención con diferentes enlazadores.
- Las Figuras 20 a 24 muestran un análisis Western Blot de anticuerpos según la presente invención con diversas mutaciones.
- Las figuras 25 y 26 muestran la función efectora de ADCC de los diversos anticuerpos, incluyendo ciertos anticuerpos de acuerdo con la invención.
- La Figura 27 muestra la expresión de diversos anticuerpos de acuerdo con la invención.
- La Figura 28 muestra un Western Blot de diversas mutaciones del anticuerpo Herceptin.
- La Figura 29 muestra un Western Blot de diversas mutaciones del anticuerpo Tysabri.
- La Figura 30 muestra un Western Blot de diversas mutaciones del anticuerpo Actemra.
- Las Figuras 31 a 34 muestran los resultados de un análisis de Thermofluor de diversos anticuerpos de acuerdo con la invención.
- Breve descripción de las secuencias**
- SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia CHI y la región de bisagra de un anticuerpo IgG1 de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia CHI y la región de bisagra de un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.
- SEQ ID NO: 3 muestra una parte de la región constante de una cadena ligera kappa de tipo salvaje humano.

SEQ ID NO: 4 muestra una parte de la secuencia N - terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgG1 humano.

SEQ ID NO: 5 muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

SEQ ID NO: 6 muestra una parte de la secuencia N - terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgG2 humano.

SEQ ID NO: 7 muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG2 humano.

5 SEQ ID NO: 8 muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgG3 humano.

SEQ ID NO: 9 muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG3 humano.

SEQ ID NO: 10 muestra una parte de la secuencia N - terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgG4 humano.

SEQ ID NO: 11 muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG4 humano.

10 SEQ ID NOs: 12 a 37 muestran las secuencias del dominio CHI y la región bisagra de los anticuerpos 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P y 44P, respectivamente.

SEQ ID NOs: 38 a 63 muestran las secuencias del dominio CHI, la región bisagra, el dominio CH2 y dominio CH3 de los anticuerpos 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P y 44P, respectivamente.

SEQ ID NO: 64 muestra las secuencias de dominio IgG4 CH2 y CH3 de tipo salvaje.

15 SEQ ID NO: 65 muestra las secuencias del dominio CH2 de IgG4 de tipo salvaje y del dominio CH3 de IgG1 de tipo salvaje.

SEQ ID NO: 66 muestra la secuencia de regiones constantes de una cadena ligera kappa de tipo salvaje humano.

SEQ ID NO: 67 muestra una parte de la secuencia N - terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgGD humano.

SEQ ID NO: 68 muestra una parte de la región bisagra de un anticuerpo IgGD humano.

20 SEQ ID NO: 69 muestra una parte de la secuencia N - terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgGM humano.

SEQ ID NO: 70 muestra una parte de la secuencia C-terminal del dominio CHI de un anticuerpo IgGM humano.

SEQ ID NO: 71 muestra una parte del dominio CH2 de un anticuerpo IgGM humano.

SEQ ID NO: 72 a 295 muestra varias regiones de bisagra.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

25 A continuación se describirá la presente invención con más detalle.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. Se pretende que "péptido" haga referencia a 10 o menos aminoácidos.

El término "polinucleótido" incluye un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm, etc., a menos que el contexto indique lo contrario.

30 Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada como "que incluye".

La expresión "tipo salvaje" en el contexto de la presente invención significa un anticuerpo como aparece en la naturaleza o puede aislarse del entorno, que no comprende ninguna mutación modificada genéticamente.

35 La designación para un mutante de sustitución en el presente documento consiste en una letra seguida por un número seguido por una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína de tipo salvaje. El número se refiere a la posición de aminoácido donde se está haciendo la sustitución de aminoácidos, y la segunda letra designa el aminoácido que se usa para reemplazar el aminoácido de tipo salvaje.

40 Los residuos en los dominios variables y constantes de anticuerpos se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se expone en Kabat et al., 1987., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en adelante en este documento Kabat *et al.* (*supra*)).

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración Kabat estricta correspondiente a un acortamiento o inserción en un componente estructural, ya sea

de la región determinante de la estructura o complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración Kabat correcta de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

5 Alternativamente, la numeración de los residuos de aminoácidos puede realizarse mediante el índice de la UE o el sistema de numeración de la UE (también descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Otro sistema de numeración de residuos de aminoácidos en anticuerpos es el sistema de numeración IMGT (Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005)).

10 El sistema de numeración Kabat se utiliza en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indique de otro modo que se utiliza el sistema de numeración EU o el sistema de numeración IMGT.

15 Entre los cuatro isotipos de IgG4, las disposiciones de la unión de disulfuro intracadena en la cadena pesada y ligera son similares, mientras que las disposiciones de la unión de disulfuro entre cadenas son únicos para cada isotipo [Revisado por (Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Kelner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Bondarenko, P.V., Ricci, M.S., Dillon, T.M., Balland, A., 2008. Human IgG2 antibodies display disulphide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem.* 283, 16194-16205)].

20 Como se muestra en la Figura 1b, las secuencias de la región bisagra de los cuatro isotipos de IgG4 difieren. La región de bisagra completa o genética típicamente consiste en los residuos 226 a 251 (numeración basada en el sistema de numeración de Kabat). La figura 1b muestra las secciones superior, central e inferior de las regiones bisagra de los cuatro isotipos IgG4. Para el isotipo IgG1, la región bisagra superior es los residuos 226 a 238, la región bisagra núcleo es los residuos 239 a 243 y la región bisagra inferior es los residuos 244 a 251. Para el isotipo IgG4, la región bisagra superior es los residuos 226 a 238, la región bisagra del núcleo es los residuos 239 a 243 y la región bisagra inferior es los residuos 244 a 251.

25 Por lo tanto, la bisagra que comprende la bisagra superior, el núcleo y la bisagra inferior en una IgG1 tiene una longitud de 23 aminoácidos como se muestra en la Figura 1a. La bisagra superior tiene 10 aminoácidos. El núcleo tiene 5 aminoácidos y la bisagra inferior tiene 8, véase por ejemplo la figura 1b.

La bisagra que comprende la bisagra superior, el núcleo y la bisagra inferior en una IgG4 tiene una longitud de 20 aminoácidos como se muestra en la Figura 1a. La bisagra superior es de 7 aminoácidos. El núcleo tiene 5 aminoácidos y la bisagra inferior tiene 8, véase por ejemplo la figura 1b.

30 Los nuevos anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención se han desarrollado modificando las disposiciones de enlace disulfuro entre cadenas dentro de IgG4, específicamente se ha modificado la disposición de enlace disulfuro entre cadenas C_L-C_{H1} entre la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC).

35 La figura 1b muestra secciones de las secuencias de cadenas pesada y ligera de IgG humana para los isotipos IgG 1-4 que indican las posiciones de cisteína (subrayadas) que forman los enlaces disulfuro de cadena intermedia C_L-C_{H1}. El enlace disulfuro entre C_L-C_{H1} de IgG1 se forma entre el LC C214 (sistema de numeración Kabat) y C233 (sistema de numeración Kabat) del HC justo antes de la región bisagra. Por el contrario, el enlace disulfuro C_{H1}-C_L para IgG2, 3 y 4 se forma entre el LC - C214 y C127 N-terminal al enlace disulfuro intracadena del HC. Las secuencias LC y HC que rodean a los residuos de cisteína implicados en la formación de enlaces disulfuro C_L-C_{H1} se muestran y se alinean en la Figura 1b.

40 La presente invención ha investigado cómo el enlace disulfuro de C_L-C_{H1} afecta a las propiedades de un anticuerpo IgG4 incluyendo la termoestabilidad, la estabilidad estructural, la heterogeneidad de isoforma de disulfuro y la afinidad del anticuerpo.

45 Los mutantes de IgG4 se generaron por sustitución del residuo de cisteína en C_{H1} en la posición 127 por otro aminoácido, así como por la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la región bisagra superior, preferiblemente aminoácidos en posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229 y 230, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat de IgG4, con cisteína. Las posiciones 227, 228, 229 o 230 están en o cerca de la posición estructural equivalente en la que está situada la cisteína 233 de IgG1.

50 Cada cadena pesada puede comprender mutaciones adicionales incluyendo la sustitución de uno o ambos residuos de cisteína 239 y 242 en la región de bisagra de IgG4 con otro aminoácido. También se incluyó en algunos anticuerpos una mutación para alargar la región de bisagra superior de IgG4 mediante tres aminoácidos entre las posiciones 238 y 239 para que tuvieran la misma longitud que la bisagra de IgG1. La mutación S241P también se introdujo en algunos anticuerpos.

Se ha encontrado que los anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención muestran propiedades ventajosas.

En una realización, los anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención muestran una

5 termostabilidad aumentada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. Se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos mutantes de IgG4 que han sido mutados para reemplazar la cisteína en la posición 127 en el dominio CHI con otro aminoácido y en los que se ha introducido una cisteína en la región de bisagra de cadena pesada entre las posiciones 227 a 230 muestran una termostabilidad comparada con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. La mutación para eliminar la cisteína en la posición 127 altera la posición en la que se forma el enlace disulfuro inter-cadena entre la cadena pesada y la cadena ligera (C_L-C_{H1}) y obliga a la cadena ligera a formar un enlace disulfuro con una cisteína que se introduce entre las posiciones 227 y 230 en la región de bisagra de la cadena pesada. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un anticuerpo IgG4 en el que la cisteína 127 se sustituye por otro aminoácido y la cisteína de la cadena ligera está unida mediante un enlace disulfuro a una cisteína modificada genéticamente en la posición 227, 228, 229 ó 230.

También se encontró sorprendentemente una mejora adicional de la termostabilidad añadiendo tres aminoácidos a la región de bisagra de IgG4 con el fin de alargar la región bisagra de IgG4.

15 También se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos IgG4 mutantes que han sido mutados para reemplazar la cisteína en la posición 127 en el dominio C_{H1} con otro aminoácido y para reemplazar la cisteína en la posición 239 o en la posición 242 en la región bisagra de la cadena pesada con otro aminoácido mostró una termostabilidad mejorada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

20 En una realización, los anticuerpos de la presente invención muestran una formación reducida de las llamadas semimoléculas. Los anticuerpos de la presente invención que comprenden una mutación en C239 pero no portan una mutación en C242 generalmente muestran una formación reducida de semimoléculas. Sin estar limitado por la teoría, se cree que esto se debe a la eliminación de la cisteína en la posición 239, reduce la formación del enlace disulfuro intracadena en la cadena pesada y por lo tanto reduce el número de semimoléculas en comparación con anticuerpos que no llevan una mutación en C239 o C242. Los anticuerpos que portan una mutación en C242 pero no portan una mutación en C239 parecen formar más semi-moléculas en comparación con los anticuerpos que portan una mutación en C239 pero no llevan una mutación en C242. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la cisteína en la posición 239 es más reactiva en comparación con la cisteína en la posición 242 y es capaz de formar un enlace disulfuro con una cisteína de bisagra de cadena pesada o con la cisteína de cadena ligera.

25 Los anticuerpos que portan la mutación tanto en C239 como en C242 forman una alta proporción de semimoléculas debido a la formación de enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas. Sin embargo, los anticuerpos que comprenden mutaciones tanto en C239 como en C242 son todavía capaces de formar moléculas de anticuerpo enteras debido a la unión de cadenas pesadas a través de enlaces no covalentes.

30 También se observa una reducción de la formación de semi-moléculas en anticuerpos que llevan la mutación S241P.

En una realización, la región de bisagra y núcleo superior se selecciona de una de las secuencias siguientes:

ESKYGPPCPSCP SEQ ID No: 108

35 ESKYGDKCPSCP SEQ ID No: 109

EPKYGPPCPSCP SEQ ID No: 110

EPKYGDKCPSCP SEQ ID No: 111

ESKSYGPPCPSCP SEQ ID No: 112

ESKSYGDKCPSCP SEQ ID No: 113

40 ESKYGPPAACPSCP SEQ ID No: 114

ESKYGPPGGCPSCP SEQ ID No: 115

ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 116

ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 117

EPKYGPPAACPSCP SEQ ID No: 118

45 EPKYGPPGGCPSCP SEQ ID No: 119

EPKYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 120

EPKYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 121

ESKSYGPPAACPSCP SEQ ID No: 122

- ESKSYGPPGGCPSCP SEQ ID No: 123
- ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 124
- ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 125
- ESKYGPPACPSCP SEQ ID No: 126
- 5 ESKYGPPGCPSCP SEQ ID No: 127
- ESKYGPPTTCPSCP SEQ ID No: 128
- ESKYGDKTTCPSCP SEQ ID No: 129
- EPSKYGPPACPSCP SEQ ID No: 130
- EPSKYGPPGCPSCP SEQ ID No: 131
- 10 EPSKYGPPTTCPSCP SEQ ID No: 132
- EPSKYGDKTTCPSCP SEQ ID No: 133
- ESKSYGPPACPSCP SEQ ID No: 134
- ESKSYGPPGCPSCP SEQ ID No: 135
- ESKSYGPPTTCPSCP SEQ ID No: 136
- 15 ESKSYGDKTTCPSCP SEQ ID No: 137
- ESKYGPPTHCPSCP SEQ ID No: 138
- ESKYGDKTHCPSCP SEQ ID No: 139
- EPSKYGPPTHCPSCP SEQ ID No: 140
- EPSKYGDKTHCPSCP SEQ ID No: 141
- 20 ESKSYGPPTHCPSCP SEQ ID No: 142
- ESKSYGDKTHCPSCP SEQ ID No: 143
- ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 144
- ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 145
- EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 146
- 25 EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 147
- ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID No: 148
- ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID No: 149
- ESKYGPPTCPSCP SEQ ID No: 150
- ESKYGDKTCPSCP SEQ ID No: 151
- 30 EPSKYGPPTCPSCP SEQ ID No: 152
- EPSKYGDKTCPSCP SEQ ID No: 153
- ESKSYGPPTCPSCP SEQ ID No: 154
- ESKSYGDKTCPSCP SEQ ID No: 155
- ESKYGPPHCPSCP SEQ ID No: 156
- 35 ESKYGDKHCPSCP SEQ ID No: 157
- EPSKYGPPHCPSCP SEQ ID No: 158
- EPSKYGDKHCPSCP SEQ ID No: 159

- ESKSYGPPHCPSCP SEQ ID No: 160
- ESKSYGDKHCPSCP SEQ ID No: 161
- EPKSCDKAACPPCP SEQ ID No: 162
- EPKSCDKGGCPPCP SEQ ID No: 163
- 5 EPKSCDKHTSPPCP SEQ ID No: 164
- EPKSCDKHTCPPSP SEQ ID No: 165
- EPKSCDKHTSPPSP SEQ ID No: 166
- EPKSCDKAASPPCP SEQ ID No: 167
- EPKSCDKAACPPSP SEQ ID No: 168
- 10 EPKSCDKAASPPSP SEQ ID No: 169
- EPKSCDKGGSPPCP SEQ ID No: 170
- EPKSCDKGGCPPSP SEQ ID No: 171
- EPKSCDKGGSPSP SEQ ID No: 172
- EPKSCDKACPPCP SEQ ID No: 173
- 15 EPKSCDKGCPPCP SEQ ID No: 174
- EPKSCDKTSPPCP SEQ ID No: 175
- EPKSCDKTCPPSP SEQ ID No: 176
- EPKSCDKTSPPSP SEQ ID No: 177
- EPKSCDKASPPCP SEQ ID No: 178
- 20 EPKSCDKACPPSP SEQ ID No: 179
- EPKSCDKASPPSP SEQ ID No: 180
- EPKSCDKGSPPCP SEQ ID No: 181
- EPKSCDKGCPPSP SEQ ID No: 182
- EPKSCDKGSPPSP SEQ ID No: 183
- 25 EPKSCDKCPCPCP SEQ ID No: 184
- EPKSCDKCPCPCP SEQ ID No: 185
- EPKSCDKSPPCP SEQ ID No: 186
- EPKSCDKCPCPCP SEQ ID No: 187
- EPKSCDKSPPSP SEQ ID No: 188
- 30 EPKSCDKSPPCP SEQ ID No: 189
- EPKSCDKCPCPCP SEQ ID No: 190
- EPKSCDKSPPSP SEQ ID No: 191
- EPKSCDKSPPCP SEQ ID No: 192
- EPKSCDKCPCPCP SEQ ID No: 193
- 35 EPKSCDKSPPSP SEQ ID No: 194
- EPKSCDKTTSPPCP SEQ ID No: 195
- EPKSCDKTTCPPSP SEQ ID No: 196

- EPKSCDKTTSPSP SEQ ID No: 197
- EPKSCDKTHSPPCP SEQ ID No: 198
- EPKSCDKTHCPPSP SEQ ID No: 199
- EPKSCDKTHSPSP SEQ ID No: 200
- 5 ESKYGPPCPPCP SEQ ID No: 201
- ESKYGPPCPPCP SEQ ID No: 202
- ESKYGPPCPPCP SEQ ID No: 203
- ESKYGDKCPPCP SEQ ID No: 204
- EPSKYGPPCPPCP SEQ ID No: 205
- 10 EPSKYGPPCPPCP SEQ ID No: 206
- EPSKYGPPCPPCP SEQ ID No: 207
- EPSKYGDKCPPCP SEQ ID No: 208
- ESKSYGPPCPPCP SEQ ID No: 209
- ESKSYGPPCPPCP SEQ ID No: 210
- 15 ESKSYGPPCPPCP SEQ ID No: 211
- ESKSYGDKCPPCP SEQ ID No: 212
- ESKYGPPAACPPCP SEQ ID No: 213
- ESKYGPPGGCPPCP SEQ ID No: 214
- ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID No: 215
- 20 ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 216
- EPSKYGPPAACPPCP SEQ ID No: 217
- EPSKYGPPGGCPPCP SEQ ID No: 218
- EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID No: 219
- EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 220
- 25 ESKSYGPPAACPPCP SEQ ID No: 221
- ESKSYGPPGGCPPCP SEQ ID No: 222
- ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID No: 223
- ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 224
- ESKYGPPACPPCP SEQ ID No: 225
- 30 ESKYGPPGCPPCP SEQ ID No: 226
- ESKYGPPTTCPPCP SEQ ID No: 227
- ESKYGDKTTCPPCP SEQ ID No: 228
- EPSKYGPPACPPCP SEQ ID No: 229
- EPSKYGPPGCPPCP SEQ ID No: 230
- 35 EPSKYGPPTTCPPCP SEQ ID No: 231
- EPSKYGDKTTCPPCP SEQ ID No: 232
- ESKSYGPPACPPCP SEQ ID No: 233

- ESKSYGPPGCPPCP SEQ ID No: 234
- ESKSYGPPTTCPPCP SEQ ID No: 235
- ESKSYGDKTTCPPCP SEQ ID No: 236
- ESKYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 237
- 5 ESKYGDKTHCPPCP SEQ ID No: 238
- EPSKYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 239
- EPSKYGDKTHCPPCP SEQ ID No: 240
- ESKSYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 241
- ESKSYGDKTHCPPCP SEQ ID No: 242
- 10 ESKYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 243
- ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 244
- EPSKYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 245
- EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 246
- ESKSYGPPTHCPPCP SEQ ID No: 247
- 15 ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID No: 248
- ESKYGPPTCPPCP SEQ ID No: 249
- ESKYGDKTCPPCP SEQ ID No: 250
- EPSKYGPPTCPPCP SEQ ID No: 251
- EPSKYGDKTCPPCP SEQ ID No: 252
- 20 ESKSYGPPTCPPCP SEQ ID No: 253
- ESKSYGDKTCPPCP SEQ ID No: 254
- ESKYGPPHCPPCP SEQ ID No: 255
- ESKYGDKHCPPCP SEQ ID No: 256
- EPSKYGPPHCPPCP SEQ ID No: 257
- 25 EPSKYGDKHCPPCP SEQ ID No: 258
- ESKSYGPPHCPPCP SEQ ID No: 259
- ESKSYGDKHCPPCP SEQ ID No: 260
- EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID No: 261
- EPKSCDKTHTCPSCP SEQ ID No: 262
- 30 ESKYCPPACPSCP SEQ ID No: 263
- ESKYCPAACPSCP SEQ ID No: 264
- ESKYCPAAACPSCP SEQ ID No: 265
- ESKYCPAAAACPSCP SEQ ID No: 266
- ESKYCPAAAACPSSP SEQ ID No: 267
- 35 ESKCGPAAAACPSCP SEQ ID No: 268
- ESKYCPAAAAACPSCP SEQ ID No: 269
- ESKYCPAAAAACPSCP SEQ ID No: 270

- ESKYCPPGGGCPSCP SEQ ID No: 271
 ESKYCPPSSSCPSCP SEQ ID No: 272
 ESKYCPPTCPSCP SEQ ID No: 273
 ESKYCPPTHCPSCP SEQ ID No: 274
 5 ESKYCPPTHCPSCP SEQ ID No: 275
 ESKYCPKTHCPSCP SEQ ID No: 276
 ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID No: 277
 ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID No: 278
 ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID No: 279
 10 ESKYCDKAAACPSCP SEQ ID No: 280
 ESKYCDKCPSCP SEQ ID No: 281
 ESKSCDKTHCPSCP SEQ ID No: 282
 EPKYCDKTHCPSCP SEQ ID No: 283
 EPKSCPPCPSCP SEQ ID No: 284
 15 ESKSCPPCPSCP SEQ ID No: 285
 EPKYCPPCPSCP SEQ ID No: 286
 ECKYGPPCPSCP SEQ ID No: 287
 ECKYGPPSPSCP SEQ ID No: 288
 ECKYGPPCPSSP SEQ ID No: 289
 20 ESCYGPPCPSCP SEQ ID No: 290
 ESCYGPPSPSCP SEQ ID No: 291
 ESCYGPPCPSSP SEQ ID No: 292
 ESKCGPPCPSCP SEQ ID No: 293
 ESKCGPPSPSCP SEQ ID No: 294
 25 ESKCGPPCPSSP SEQ ID No: 295

Los anticuerpos según la presente invención también muestran una afinidad comparable con respecto al antígeno diana comparado con el anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

- 30 Las mutaciones a los anticuerpos de la presente invención se describirán ahora con más detalle. Los métodos para reemplazar aminoácidos son bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida a sitios usando métodos tales como PCR para eliminar y/o sustituir aminoácidos o el diseño de novo de secuencias sintéticas.

La Figura 2a muestra los residuos de bisagra de IgG1 de tipo salvaje, IgG4 de tipo salvaje y las posiciones en las que se han introducido mutaciones en los anticuerpos de la presente invención. Numeración basada en el sistema de numeración Kabat.

- 35 Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención comprenden una mutación en la posición 127 (C127), en la que el residuo de cisteína se sustituye por otro aminoácido, preferiblemente un aminoácido que no contiene un grupo tiol. Por reemplazo o sustitución se quiere decir que cuando la cisteína 127 inter-cadena se encuentra normalmente en la cadena pesada del anticuerpo, otro aminoácido está en su lugar. La mutación en C127 puede ser cualquier mutación adecuada a uno, dos o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido en la posición 127
 40 que cambia el residuo de aminoácido de cisteína a otro aminoácido adecuado. Ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen serina, treonina, alanina, glicina o cualquier aminoácido polar. Un aminoácido particularmente preferido es la serina.

- 5 La sustitución de la cisteína en la posición 127 por otro aminoácido elimina la cisteína en el dominio C_H1 que normalmente forma un enlace disulfuro con una cisteína en la cadena ligera en la IgG4 de tipo salvaje. Por lo tanto, para formar un apareamiento de cadena ligera y cadena pesada a través de un enlace disulfuro entre cadenas, la cadena ligera debe formar un enlace disulfuro con una cisteína que está situada en la región de bisagra de la cadena pesada.
- En un primer aspecto de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención comprenden una cadena pesada en la que uno o más de los aminoácidos en las posiciones seleccionadas de 227, 228, 229 y 230, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, están sustituidos con cisteína. Por consiguiente, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden llevar una o más de las siguientes mutaciones:
- 10
- S227C
 - K228C
 - Y229C
 - G230C
- Preferiblemente, sólo un resto seleccionado entre 227, 228, 229 y 230 está sustituido con un residuo de cisteína.
- 15 Los anticuerpos particularmente preferidos de la presente invención llevan la mutación Y229C o G230C.
- La inclusión de un residuo de cisteína en una posición seleccionada de 227, 228, 229 y 230, en la región de bisagra de la cadena pesada proporciona una nueva posición para un enlace disulfuro entre cadenas para formar entre la cadena pesada y la cadena ligera. Los presentes inventores han descubierto que esta nueva disposición de enlaces disulfuro entre cadenas proporciona anticuerpos IgG4 que tienen termoestabilidad mejorada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.
- 20 Pueden introducirse mutaciones adicionales en los anticuerpos de este aspecto de la presente invención. En una realización, la cisteína en la posición 239 (C239) y/o la cisteína en la posición 242 (C242), numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la cadena pesada se sustituyen con otro aminoácido, preferiblemente un aminoácido que no contiene un grupo tiol. Por reemplazo o sustitución se quiere decir que cuando la cisteína 239 y/o la cisteína 242 se encuentran normalmente en la cadena pesada del anticuerpo, está en su lugar otro aminoácido. La mutación en C239 y/o C242 puede ser cualquier mutación adecuada a uno, dos o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido que cambia el residuo de aminoácido de cisteína a otro aminoácido adecuado. Ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen serina, treonina, alanina, glicina o cualquier aminoácido polar. Un aminoácido particularmente preferido es la serina.
- 25 En una realización, la cisteína en la posición 239 en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido y la cisteína en la posición 242 en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido. En esta realización, la sustitución de C239 y C242 elimina ambos residuos de cisteína en la región bisagra de la cadena pesada que normalmente forman enlaces disulfuro de cadena inter-pesada con las cisteínas correspondientes en otra cadena pesada. Las semimoléculas resultantes pueden formar moléculas de anticuerpo enteras a través de la unión no covalente entre dos cadenas pesadas.
- 30 En una realización alternativa, la cisteína en la posición 239 en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido. En esta realización, la cisteína en la posición 242 no está sustituida con otro aminoácido.
- 35 En otra realización alternativa, la cisteína en la posición 242 en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido. En esta realización, la cisteína en la posición 239 no está sustituida con otro aminoácido.
- 40 La sustitución de C239 o C242 deja una cisteína en la cadena pesada que es capaz de formar un enlace disulfuro de cadena inter-pesada con una cisteína en otra cadena pesada. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la sustitución de una cisteína en la región bisagra, particularmente la sustitución de C239, reduce la formación de un enlace disulfuro intracadena en la región bisagra y, por tanto, puede reducir la formación de moléculas de medio anticuerpo.
- 45 En una realización de la presente invención, en la que la serina en la posición 227 está sustituida con una cisteína, el anticuerpo preferiblemente no comprende mutaciones en las posiciones C239 y C242. En otra realización, en la que la serina en la posición 227 está sustituida con una cisteína, la cisteína en la posición 239 en la cadena pesada está preferiblemente sustituida con otro aminoácido, pero la cisteína en la posición 242 no está sustituida con otro aminoácido.
- 50 En una realización, los anticuerpos de la presente invención comprenden una cadena pesada de IgG4 que está mutada para insertar uno o más aminoácidos entre los aminoácidos 226-243. El número de aminoácidos insertados puede ser de 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 aminoácidos. Los aminoácidos se insertan preferiblemente entre los aminoácidos 238 y 239. Pueden insertarse cualesquiera aminoácidos adecuados en la

- región bisagra, tales como alaninas, glicinas, serinas o treoninas y combinaciones de las mismas. Preferiblemente se insertan tres alaninas (AAA), tres glicinas (GGG), tres serinas (SSS) o tres treoninas (TTT) o una treonina, histidina y otra treonina (THT). Se ha encontrado que los anticuerpos de la presente invención que comprenden una cadena pesada de IgG4 que ha sido mutada para insertar tres aminoácidos en la región bisagra muestran una termostabilidad mejorada.
- 5
- Otra mutación que puede introducirse en los anticuerpos de acuerdo con la presente invención es la mutación S241P. Se ha demostrado previamente que esta mutación reduce la formación de semimoléculas (Angal, S. et al., 1993. Una sola sustitución de aminoácidos suprime la heterogeneidad del anticuerpo quimérico ratón/humano (IgG4). *Mol Immunol* 30, 105-108).
- 10
- Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender una o más mutaciones adicionales en la región bisagra. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender además una o más de las siguientes mutaciones S227P, Y229S, P237D y P238K.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende efectivamente una región de bisagra de IgG1 del residuo 226 a 243 (bisagra superior y bisagra de núcleo). Por consiguiente, el anticuerpo de la presente invención comprende una región bisagra en la que la glicina en la posición 230 está sustituida con cisteína, la serina en la posición 227 está sustituida con prolina, la tirosina en la posición 229 está sustituida con serina, la prolina en la posición 237 está sustituida con ácido aspártico, la prolina en la posición 238 está sustituida con lisina, la secuencia de aminoácidos treonina-histidina-treonina se inserta entre las posiciones 238 y 239 y la serina en la posición 241 se sustituye con prolina. Estas mutaciones también pueden escribirse como S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KHT y S241P, como se muestra en la Figura 2a. Se ha encontrado que la introducción de estas mutaciones adicionales a la región de bisagra de IgG4 proporciona un anticuerpo que tiene termostabilidad mejorada.
- 15
- 20
- El anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene preferiblemente una bisagra inferior IgG4 del residuo 244 a 251 (APEFLGGP). Sin estar limitado por la teoría se cree que la región de bisagra inferior IgG4 contribuye a la falta de función efectora de un anticuerpo IgG4.
- 25
- En un segundo aspecto de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada en la que la cisteína en la posición 127 está sustituida con otro aminoácido, como se ha descrito anteriormente, y la cisteína en la posición 239 o la cisteína en la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido. En este segundo aspecto, ninguno de los residuos en las posiciones 227, 228, 229 y 230 está sustituido con un residuo de cisteína.
- 30
- Sorprendentemente, se ha encontrado que los anticuerpos según el segundo aspecto de la presente invención tienen termostabilidad mejorada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.
- En el segundo aspecto de la presente invención, el anticuerpo puede comprender una o más mutaciones adicionales. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG4 que está mutada para insertar tres aminoácidos entre los aminoácidos 226-243, preferiblemente entre los aminoácidos 238 y 239, como se ha descrito anteriormente. En una realización adicional, el anticuerpo comprende la mutación S241P. En una realización adicional, el anticuerpo puede comprender además una o más de las siguientes mutaciones S227P, Y229S, P237D y P238K.
- 35
- La Tabla 1 a continuación muestra ejemplos de anticuerpos de la presente invención y las mutaciones que se han introducido comparadas con la secuencia de tipo salvaje de IgG4. La Tabla 1 también incluye anticuerpos de tipo salvaje IgG1 e IgG4 y anticuerpos de control.
- 40

Tabla 1:

Número de anticuerpo	Mutaciones de Cadena Pesada (Numeración Kabat)	C _H 1 dominio & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
1	C127S	-	-
2	C127S, C239S	33	59
3	C127S, C242S	34	60
6	C127S, G230C, C239S	12	38
7	C127S, G230C, C242S	13	39
8	C127S, G230C, C239S, C242S	14	40
12	C239S	-	-
13	C242S	-	-
15	C127S, G230C	15	41
16	C127S, G230C, S241P	16	42
17	IgG4 Humana tipo salvaje	2	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 Humana tipo salvaje	1	-
28	C127S Y229C	17	43
28P	C127S Y229C, S241P	36	62
29	C127S Y229C C239S	18	44
30	C127S Y229C C242S	19	45
31	C127S Y229C C239S C242S	20	46
32	C127S K228C	21	47
33	C127S K228C C239S	22	48
34	C127S K228C C242S	23	49
35	C127S K228C C239S C242S	24	50
36	C127S S227C	25	51
37	C127S S227C C239S	26	52
38	C127S S227C C242S	27	53

ES 2 632 571 T3

Número de anticuerpo	Mutaciones de Cadena Pesada (Numeración Kabat)	C _H 1 dominio & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
39	C127S S227C C239S C242S	28	54
44	C127S G230C P238PAAA	29	55
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	37	63
45	C127S G230C P238PAAA C239S	30	56
46	C127S G230C P238PAAA C242S	31	57
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	32	58
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	35	61
49	C127S G230C P232PA		
50	C127S G230C P232PAA S241P		
51	C127S, G230C, P232PAAAA		
52	C127S, G230C, P232PAAAAA		
55	C127S, G230C, P232PTHT		
56	C127S, G230C, P231D, P232KTHT		
57	C127S, G230C, P232PGGG		
60	C127S, S227P, G230C		
62	C127S, Y229S, G230C		
64	C127S, S227P, Y229S, G230C		
65	P237D, P238KTHT		
66	C127S, G230C, P231D, P232KTH		
67	C127S, G230C, P231D, P232KT		
68	C127S, G230C, P231D, P232K		
69	C127S, G230C P231D, P232KAAA		
71	C127S, S227P, G230C, P231D, P232KTHT		
73	C127S, Y229S, G230C, P231D, P232KTHT		

Las Figuras 3a y 4a muestran también las mutaciones introducidas en anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención. Las Figuras 3b y 4b muestran las posiciones de los residuos de cisteína en los anticuerpos IgG4 de la

presente invención y también muestran la unión predicha de la cisteína a una cisteína en la cadena ligera (LC) u otra cadena pesada (HC). Para los residuos de cisteína que muestran (LC o HC), es posible que la cisteína se una a una cisteína en la cadena ligera o la cadena pesada, pero donde se subraya que la LC o HC es el enlace disulfuro que se cree que ocurre predominantemente.

5 En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una cadena pesada, en el que cada cadena pesada comprende un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48 como se muestra en la Tabla 1. De acuerdo con esto, la presente
10 invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una cadena pesada, en el que cada cadena pesada comprende un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37.-

15 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención comprende al menos una cadena pesada en la que cada cadena pesada comprende un dominio C_H1 y una región bisagra y comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:
20 36 y SEQ ID NO: 37.- Más preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende al menos una cadena pesada en la que cada cadena pesada comprende un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37.-

25 En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una cadena pesada, donde cada cadena pesada comprende un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado a partir de 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una cadena
30 pesada, en el que cada cadena pesada comprende un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63.-

Un anticuerpo particularmente preferido de la presente invención comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_H1 y una región bisagra, en la que la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 36 (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: 37 (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO:35 (anticuerpo 48). Otro anticuerpo particularmente
40 preferido de la presente invención comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 en el que la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 62 (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: 63 (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO:61 (anticuerpo 48). Los anticuerpos 28P, 44P y 48 son particularmente preferidos porque muestran una termoestabilidad significativamente mejorada y además muestran una formación reducida de semimoléculas.

Se ha demostrado que los anticuerpos 2, 3 y 8 forman una cantidad significativa de las denominadas semimoléculas (HL). Estos mutantes pueden formar moléculas enteras de anticuerpo (H2L2) in vitro en condiciones no
45 desnaturizantes, pero cualquier asociación no covalente entre las cadenas pesadas y/o entre cadenas pesadas y ligeras se elimina en condiciones SDS-PAGE no reductoras. Aunque a menudo se enseña que es deseable reducir la formación de semimoléculas, los anticuerpos que tienen una tendencia incrementada a formar semimoléculas pueden ser ventajosos para ciertos usos. Los anticuerpos que forman semi-moléculas estables (HL) y poco o ningún anticuerpo completo (H2L2), debido a que la cadena pesada del anticuerpo es incapaz de formar una asociación
50 covalente o no covalente con otra cadena pesada, son de particular interés. Los anticuerpos que forman semimoléculas estables pueden ser ventajosos para la producción de anticuerpos monovalentes. Los anticuerpos que forman semimoléculas también pueden proporcionar una forma útil de producir un anticuerpo biespecífico debido a la formación de anticuerpos enteros a partir de semimoléculas que tienen diferentes especificidades, en donde el anticuerpo completo es biespecífico y monovalente para cada antígeno.

El anticuerpo 3 retiene C239 en la región de bisagra, pero parece incapaz de formar enlaces de disulfuro de cadena pesada entre-bisagra, presumiblemente debido a la formación eficiente de un disulfuro entre la cisteína de cadena ligera C-terminal y la bisagra C239. Una comparación de los anticuerpos 2 y 3 muestra la extensión del 'alcance' de la cisteína C-terminal de la cadena ligera, en la que el disulfuro de la cadena ligera se une más eficientemente a C239 que a C242 en la región bisagra. Además, el anticuerpo 3 muestra una estabilidad incrementada en
60 comparación con el anticuerpo 2.

- Aunque los anticuerpos mutados de acuerdo con la presente invención se describen anteriormente con respecto al isotipo IgG4, el experto en la materia apreciará que las mutaciones hechas al anticuerpo IgG4 también pueden aplicarse a otros isotipos o clases de anticuerpos que tienen la misma disposición de enlaces disulfuro que un anticuerpo IgG4 con el fin de proporcionar un anticuerpo mejorado. Ejemplos específicos de anticuerpos que tienen la misma disposición de enlace disulfuro que un anticuerpo IgG4 son anticuerpos IgG3, anticuerpos IgM e IgD. Como se muestra en la Figura 1b, IgG3 e IgM tienen una cisteína en la posición 127 en el dominio C_{H1} e IgD tiene una cisteína en la posición 128 en el dominio C_{H1} que es equivalente al C127 en el dominio C_{H1} de IgG4 que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en la cadena ligera. Además, también puede verse en la figura 1b que las regiones bisagra superiores de IgG3 e IgD y la región C-terminal del dominio C_{H1} y la región N-terminal del dominio C_{H2} en IgM no contienen un residuo de cisteína que sea equivalente a los residuos de la región bisagra superior de IgG1. Por consiguiente, la presente invención proporciona además un anticuerpo IgG3, un anticuerpo IgD y un anticuerpo IgM en el que la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido y en la que uno o más aminoácidos que están en una posición estructuralmente análoga a la región bisagra superior de IgG1 o IgG4 están sustituidos con cisteína.
- 5 Por consiguiente, la presente invención también proporciona un anticuerpo de la clase IgG3 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:
- 15 a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y
 - b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra superior está sustituido con cisteína.
- 20 En una realización preferida del aspecto del anticuerpo IgG3 de la presente invención, la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en una cadena ligera es la cisteína en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en la figura 1b y 2b.
- En una realización preferida del aspecto de anticuerpo IgG3 de la presente invención, uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior que puede estar sustituida con cisteína son uno o más de los aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre 226, 227, 228, 229, 230, 232 y 233, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las figuras 1b y 2b.
- 25 La presente invención proporciona además un anticuerpo de la clase IgM que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, en el que en cada cadena pesada:
- 30 a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y
 - b. uno o más de los aminoácidos situados en el dominio C_{H1} o dominio C_{H2} está sustituido con cisteína.
- En una realización preferida del aspecto de anticuerpo IgM de la presente invención, la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en una cadena ligera es la cisteína en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las figuras 1b y 2c.
- 35 En una realización preferida del aspecto del anticuerpo IgM de la presente invención, uno o más aminoácidos situados en el extremo C-terminal del dominio C_{H1} o el extremo N-terminal del dominio C_{H2} están sustituidos con cisteína. La posición preferida de aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio C_{H1} que puede estar sustituido con cisteína es uno o más de los aminoácidos en posiciones seleccionadas entre 223, 223A, 223B y 223C, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las figuras 1b y 2c. La posición preferida de aminoácidos en el extremo N-terminal del dominio C_{H2} que puede estar sustituido con cisteína es uno o más de los aminoácidos en posiciones seleccionadas de 243G, 243H y 243I, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las Figuras 1b y 2c. Por consiguiente, uno o más de los aminoácidos 223 a 243 pueden estar sustituidos con cisteína.
- 40 La presente invención proporciona además un anticuerpo de la clase IgD que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra, en el que en cada cadena pesada:
- 45 a. la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro inter-cadena con una cisteína en una cadena ligera está sustituida con otro aminoácido; y
 - b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra están sustituidos con cisteína.
- 50 En una realización preferida del aspecto del anticuerpo IgD de la presente invención, la cisteína en el dominio C_{H1} que forma un enlace disulfuro entre cadenas con una cisteína en una cadena ligera es la cisteína en la posición 128 numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, tal como se muestra en las figuras 1b y 2d.
- La región bisagra de un anticuerpo IgD puede definirse como R224-P243, de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

En una realización preferida del aspecto de anticuerpo IgD de la presente invención, uno o más aminoácidos situados en la región bisagra que están sustituidos con cisteína son uno o más de los aminoácidos en posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229, 230, 231, 232 y 233, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, como se muestra en las figuras 1b y 2d.

- 5 Los anticuerpos IgG3, IgD o IgM proporcionados por la presente invención pueden comprender una o más mutaciones adicionales a la región bisagra como se discutió anteriormente con respecto al anticuerpo IgG4.

El término 'anticuerpo' tal como se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos intactos (enteros) y fragmentos funcionalmente activos que comprenden al menos una cadena pesada que comprende un dominio V_H , un dominio C_{H1} y una región bisagra. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente al menos una cadena ligera. Por consiguiente, el término "anticuerpo" en la presente invención cubre anticuerpos bi, tri o tetravalentes, fragmentos, Fab' y $F(ab')_2$, moléculas de medio anticuerpo o semimoléculas que comprenden un único emparejamiento de cadena ligera y cadena pesada y moléculas de anticuerpo enteras que comprenden dos emparejamientos de cadena ligera y cadena pesada.

10 Como es bien conocido en la técnica, una molécula Fab' típica comprende un par de cadenas pesada y ligera en el que la cadena pesada comprende una región variable V_H , un dominio constante $CH1$ y una región bisagra y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio CL constante.

En una realización, se proporciona un dímero de Fab' de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, la dimerización puede ser a través de la bisagra.

20 En una realización, la cadena pesada comprende un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y opcionalmente un dominio C_{H4} . En una realización, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas cada una de las cuales es como se definió anteriormente en el primer o segundo aspecto de la presente invención. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también comprenden preferiblemente dos cadenas ligeras. En esta realización, en la que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, preferiblemente ambas secuencias de cadena pesada son idénticas como se define anteriormente por el primer o segundo aspecto de la presente invención.

25 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo completo que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un $CH1$ de IgG4 en el que la cisteína en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat está sustituida con otro aminoácido, una región de bisagra superior e intermedia de IgG1, una región bisagra inferior de IgG4, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} .

30 La región bisagra completa de un anticuerpo IgG4 típicamente consiste en los residuos 226 a 251 (numeración basada en el sistema de numeración Kabat). Sin embargo, la región bisagra puede acortarse o alargarse según se requiera. Por ejemplo, los anticuerpos según el primer aspecto de la presente invención, el aminoácido de tipo salvaje está sustituido con un residuo de cisteína en la posición 227, 228, 229 o 230, la región bisagra puede terminar después del nuevo residuo de cisteína en las posiciones 227, 228, 229 ó 230. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender también uno o más aminoácidos adicionales situados en el extremo N-terminal y/o en C-terminal de la región bisagra. Además, se pueden controlar otras características de la bisagra, tales como la distancia de la (s) cisteína (s) de bisagra de la cisteína intercadenante de la cadena ligera, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de otros aminoácidos en la bisagra que pueden afectar a las propiedades de la bisagra tales como la flexibilidad; por ejemplo, se pueden incorporar glicinas en la bisagra para aumentar la flexibilidad de rotación o pueden incorporarse prolina para reducir la flexibilidad. Alternativamente, se pueden incorporar combinaciones de residuos cargados o hidrófobos en la bisagra para conferir propiedades de multimerización o purificación. Otras regiones de bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas y pueden diseñarse para poseer propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad.

40 Los dominios de regiones constantes, en particular en el dominio F_c , cuando están presentes, empleados en la presente invención, son preferiblemente de isotipo de IgG4, cuando no se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Según cada cadena pesada preferiblemente comprende un dominio C_{H2} de IgG4 y un dominio C_{H3} , como se muestra en la SEQ ID NO: 64.

Se apreciará que también se pueden usar variantes de secuencia de los dominios de la región constante F_c .

50 En una realización, cada cadena pesada comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG4 en los que la arginina en la posición 409 (numeración UE) está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina con el fin de inhibir la formación de agregados a pH bajo (documento de EE.UU. 2008/0063635 Takahashi et al.). Las mutaciones en L235, D265, D270, K322, P331 y P329 (numeradas según el sistema de numeración de la UE) también se enseñan con el fin de atenuar la actividad de CDC (documento de EE.UU. 2008/0063635 Takahashi et al.).

55 Cada cadena pesada puede comprender las mutaciones como se describe en el documento WO2008/145142 de Van de Winkel et al. que describe anticuerpos IgG4 estables que tienen una capacidad reducida de experimentar intercambio de brazo Fab por sustitución del residuo arginina en la posición 409, el residuo Phe en la posición 405 o el Lys en la posición 370 (numerado de acuerdo con el sistema de numeración de la UE).

En una realización, cada cadena pesada comprende un dominio C_H2 de IgG4 y un dominio C_H3 de IgG1, como se muestra en la SEQ ID NO: 65.

En la realización de la presente invención en la que el anticuerpo es un anticuerpo mutado de IgG3, IgD o IgM, cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_H2 y un dominio C_H3, y opcionalmente un dominio C_H4. En el anticuerpo IgG3, cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_H2 de IgG3 y un dominio C_H3 de IgG3. En el anticuerpo IgD, cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_H2 de IgD y un dominio C_H3 de IgD. En el anticuerpo IgM, cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_H2 de IgM, un dominio C_H3 de IgM y un dominio C_H4 de IgM.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monoclonal, totalmente humano, humanizado o quimérico. En una realización, el anticuerpo es totalmente humano o humanizado.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para uso en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocitos únicos por clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos por, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15), 7843-7848, documentos WO 92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región de armazón de una molécula de inmunoglobulina humana que opcionalmente comprende uno o más residuos donantes de la especie no humana (véase, por ejemplo, el documento de EE.UU. 5.585.089).

Los anticuerpos para uso en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958; Persic et al., *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton et al., *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; los documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y los documentos de EE.UU. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108. También, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos totalmente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) tanto de las cadenas pesada como ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos totalmente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de región variable y/o constante de inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ej., como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 B1 y EP0463151 B1.

El material de partida de anticuerpo para uso en la presente invención puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y reexpresión de ADN que codifica las regiones variable y constante de anticuerpo. Se pueden usar técnicas de biología molecular estándar para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Cualesquiera alteraciones a las regiones variables o constantes son todavía abarcadas por los términos regiones 'variables' y 'constantes' como se usan en este documento.

El material de partida del anticuerpo se puede obtener de cualquier especie incluyendo por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o humano. Partes del anticuerpo pueden obtenerse a partir de más de una especie, por ejemplo, el anticuerpo puede ser quimérico. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del anticuerpo también puede ser modificado. En otro ejemplo, la región variable del anticuerpo se ha creado usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Tales versiones de ingeniería incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpo natural mediante inserciones, deleciones o cambios en o a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Ejemplos particulares de este tipo incluyen aquellos dominios de región variable modificados que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos estructurales de un anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boss et al., documento de EE.UU. 4.816.397; Cabilly et al., documento de EE.UU. 6,331,415; Shrader et al., documento WO 92/02551; Ward et al., 1989, *Nature*, 341, 544; Orlandi et al., 1989, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 322, 323; Bird et al, 1988, *Science*, 242, 423; Queen et al., documento de EE.UU. 5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain and Adair, 1992,

Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

En una realización, el anticuerpo comprende un par de dominios variables que forman un dominio de unión es un par afín. El par cognado, tal como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a un par natural de dominios variables, es decir, aislado a partir de un único anticuerpo o célula que expresa un anticuerpo.

5 Los dominios variables pueden haber sido optimizados y/o humanizados.

Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par afín se seguirán considerando un par afín después de la optimización/humanización.

De este modo, la invención se extiende a moléculas humanas, humanizadas o quiméricas.

10 En una realización, la molécula se une específicamente a un antígeno diana. Tal como se emplea en este documento, se une específicamente se refiere específicamente a las moléculas que tienen alta afinidad para un antígeno diana (al cual es específico) y que se une a antígenos a los que no es específico con una afinidad baja o mucho menor (o sin afinidad en absoluto). Los métodos para medir la afinidad son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen ensayos tales como BIAcore™.

15 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular nanomolar o pico molar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore™. En una realización, la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50pM o mejor. En una realización, la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40pM o mejor. En una realización, la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30pM o mejor. En una realización, la molécula de la presente invención es totalmente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o mejor.

20 Un derivado de un dominio natural tal como se emplea en la presente memoria pretende referirse a cuando uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia natural se han reemplazado o eliminado, por ejemplo para optimizar las propiedades del dominio tal como eliminando propiedades indeseables, pero en el que se conserva la característica o las características del dominio.

25 En una realización, las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden uno o más péptidos de unión a la albúmina. In vivo, el péptido se une a la albúmina, lo que aumenta la semivida de la molécula.

30 El péptido de unión a la albúmina puede estar unido a partir de una o más regiones variables, una bisagra o C-terminal de la molécula o cualquier localización que no interfiera con las propiedades de unión a las moléculas de antígeno.

Ejemplos de péptidos de unión a la albúmina se proporcionan en el documento WO 2007/106120.

35 También será entendido por cualquier experto en la técnica que el anticuerpo puede sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y la extensión de estas modificaciones dependen a menudo de la línea celular huésped utilizada para expresar la molécula así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995).

40 Si se desea, una molécula para uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de tal modo que formen un solo resto que puede unirse a la molécula de anticuerpo de la presente invención. Cuando se desea obtener un anticuerpo de acuerdo con la invención unido a una molécula efectora, éste puede prepararse mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el anticuerpo está unido, ya sea directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar estas moléculas efectoras con un anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlace puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

55 La expresión molécula efectora, tal como se utiliza en este documento, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales

quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse por espectroscopía de RMN o ESR.

Ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para (por ej. mata) las células. Ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, 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.

- 5
- 10 Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y la lomustina (CCNU), la ciclotosfamida, el busulfan, el dibromomannitol, la estreptozotocina, la mitomicina C y la cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomycin)), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).
- 15

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsten 188 /Renio 188 , o fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

- 20 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , Factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo Angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.
- 25

- 30 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bio luminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase generalmente la Patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .
- 35

- 40 En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina tales como los descritos en el documento WO 05/117984.

- 45 Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo un polímero de polialquileño, polialquenileno o polioxialquileño de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo- o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos antes mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

- 50 Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli (etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli (alcohol vinílico) de poli (propilenglicol) o derivados de los mismos, especialmente poli (etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli (etilenglicol) o derivados de los mismos.

Los polímeros específicos naturales comprenden lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

- 55 "Derivados", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo formará parte en algunos casos del producto como el grupo de unión entre el anticuerpo de la descripción y el polímero.

El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio de 500Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso pretendido del producto, por ejemplo, la capacidad para localizarse a ciertos tejidos tales como tumores o prolongar la semivida en circulación (para una revisión véase

5

Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto salga de la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de pequeño peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular más alto, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000Da a 40000Da.

10

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli (etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli (etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

15

En un ejemplo, un anticuerpo para uso en la presente invención está unido a restos de poli (etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, las moléculas de PEG pueden estar unidas a través de cualquier grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos disponible o grupo aminoácido terminal situado en el anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden ocurrir naturalmente en el anticuerpo o pueden ser modificados genéticamente en el anticuerpo usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento de EE.UU. 5.219.996; documento de EE.UU. 5.667.425; documento WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de la presente invención es un anticuerpo modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

20

En una realización, una molécula de PEG está unida a una cisteína 171 en la cadena ligera, por ejemplo véase el documento WO2008/038024.

25

Convenientemente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína situado en el anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al anticuerpo modificado puede estar unida covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína situado en el anticuerpo. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo pueden usarse derivados selectivos de tiol tales como maleimidados y derivados de cisteína. Como material de partida se puede utilizar un polímero activado en la preparación del anticuerpo modificado con polímero como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido o un éster de α -halocarboxílico, por ej. yodoacetamida, una imida, por ej. maleimida, una sulfona de vinilo o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

30

35

La presente invención también proporciona ADN aislado que codifica una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria.

40

En un aspecto adicional se proporciona un vector que comprende dicho ADN.

Los métodos generales mediante los cuales pueden construirse los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

45

En un aspecto adicional se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector y/o ADN.

Cualquier sistema célula huésped/vector adecuado puede usarse para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de la presente invención. Pueden utilizarse bacterias, por ejemplo E. coli, y otros sistemas microbianos, o pueden utilizarse también sistemas de expresión de células eucarióticas, por ejemplo mamíferos. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO, mieloma o hibridoma.

50

La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo como se describe en este documento que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector (y/o ADN) de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir de ADN que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar una molécula de anticuerpo.

55

Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede

transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, incluyendo el vector las secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

5 Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción se expresan a niveles adecuados a partir de células huésped, haciéndolas conducentes al procesamiento comercial.

10 El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a células, por ejemplo una proteína de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tales como aquellas proteínas reguladas positivamente durante la enfermedad o la infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas β 1, por ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 o CSF1-Receptor, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectin-tipo 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos MHC de la Clase I y MHC Clase II, KDR y VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, IL-7 receptor A y, cuando corresponda, receptores de los mismos.

20 Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos víricos, por ejemplo, el virus respiratorio sincicial o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , TNF de factor de necrosis tumoral (anteriormente conocido como factor- α de necrosis tumoral y denominado en la presente memoria TNF o TNF α), factor- β de necrosis tumoral, factores estimuladores de colonias tales como G-CSF o GM-CSF y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β , WISP-1 y, en su caso, receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie de células bacterianas, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes bioterroristas, radionucleidos y metales pesados y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

30 En una realización, el anticuerpo puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de un estado patológico.

35 Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para uso en tratamiento, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo, por ejemplo en una formulación farmacéutica. En una realización, el anticuerpo según la invención se administra tópicamente a los pulmones, por ejemplo por inhalación.

Los anticuerpos proporcionados por la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunitarios, trastornos fibróticos y cánceres.

40 La expresión "enfermedad inflamatoria" o "trastorno" y "enfermedad o trastorno inmune" incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LES (lupus eritematoso sistémico), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus tipo I, trasplante y enfermedad de injerto contra huésped.

45 La expresión "trastorno fibrótico" incluye fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica (o esclerodermia), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, hipertensión, enfermedad renal terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), retinopatía, fibrosis cardíaca reactiva, cicatrices, queloides, quemaduras, úlceras cutáneas, angioplastia, cirugía de bypass coronario, artroplastia y cirugía de cataratas.

50 El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, que se encuentra en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de los órganos del cuerpo, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y a propagarse (metastatizar) a órganos distantes, por ejemplo: hueso, hígado, pulmón o cerebro.

55 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición

farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar el anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 El anticuerpo de la descripción puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañado de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-células T, anti-IFN γ o anticuerpos anti-LPS, o ingredientes no-anticuerpo tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

15 En una realización adicional, el anticuerpo o composición de acuerdo con la descripción se emplea en combinación con otro agente farmacéuticamente activo, por ejemplo un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación celular (tales como rapamicina, ciclofosfina, metotrexato) o un inhibidor alternativo de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico del objetivo.

20 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información puede usarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación o combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada por la experimentación de rutina y está dentro del criterio del clínico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

30 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultánea, secuencial o separadamente) con otros agentes, fármacos u hormonas.

35 La dosis a la que se administra un anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, por ejemplo, la extensión de la enfermedad/inflamación presente y si la molécula se está usando profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media del anticuerpo y de la duración de su efecto. Si el anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. Alternativamente, si el anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), sólo puede ser necesario dar una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

40 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe por sí mismo inducir la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

45 Pueden utilizarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

50 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes de pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

55 Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, p. ej. por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de la descripción puede estar en forma seca, para la reconstitución

antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

5 Convenientemente, en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo, por ejemplo si el pH de la formulación es 7 entonces un pl de 8-9 o superior puede ser apropiado. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo permanece en solución.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías incluyendo, pero no limitándose a, vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

15 La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o suministrada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será un anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una ruta utilizando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protegen el anticuerpo frente a la degradación pero que liberan el anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

25 Una discusión completa de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas incluyendo la inhalación.

30 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, dosificadores de aerosoles que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contiene la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

35 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligos y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de éstos entre sí. Se utilizan adecuadamente mono- o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

40 Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo de 0,1 a 5 µm, en particular de 1 a 5 µm. El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo) es de importancia primordial.

45 Los gases propulsores que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores antes mencionados pueden usarse solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados anteriormente mencionados, TGI 34a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

50 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como co-disolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5% en

peso, 0,01 a 3% en peso, 0,015 a 2% en peso, 0,1 a 2% en peso, 0,5 a 2% en peso, o de 0,5 a 1% en peso del ingrediente activo.

5 Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una solución líquida o formulación en suspensión, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master (R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

10 El anticuerpo de la invención se puede suministrar dispersado en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tampón conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para conseguir un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, una molécula liofilizada.

15 Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará en general en una forma sustancialmente estéril empleando procedimientos de fabricación estériles.

20 Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponado usado para la formulación, suspensión aséptica de la molécula en la disolución disolvente tamponada estéril y dispensación de la formulación en recipientes estériles por métodos familiares a los expertos ordinarios en la materia.

25 La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción puede proporcionarse, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) envasados en sobres de lámina. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml de tampón disolvente/disolución.

Se cree que el anticuerpo de la presente descripción es particularmente adecuado para la administración mediante nebulización.

Comprender en el contexto de la presente memoria descriptiva se pretende que signifique que incluye.

Cuando se pueden combinar realizaciones técnicamente apropiadas de la invención.

30 La invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1 Mutagénesis de la cadena pesada de IgG4 y generación de vectores de un solo gen de la cadena pesada de IgG4 mutada.

35 Las mutaciones de aminoácidos se realizaron usando el Kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quickchange® Lightning (SDM) o el kit Quickchange® II DSM (obtenido de Stratagene®) (números de catálogo 210516 y 200521, respectivamente) y realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las mutaciones se verificaron por secuenciación de ADN. Se produjeron las cadenas pesadas de IgG4 de al menos los anticuerpos 1 a 47 en la siguiente tabla:

Número de anticuerpo	Mutaciones de Cadena Pesada (Numeración Kabat)	C _H 1 dominio & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
1	C127S	-	-
2	C127S, C239S	33	59
3	C127S, C242S	34	60
6	C127S, G230C, C239S	12	38
7	C127S, G230C, C242S	13	39

ES 2 632 571 T3

Número de anticuerpo	Mutaciones de Cadena Pesada (Numeración Kabat)	C _H 1 dominio & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
8	C127S, G230C, C239S, C242S	14	40
12	C239S	-	-
13	C242S	-	-
15	C127S, G230C	15	41
16	C127S, G230C, S241P	16	42
17	IgG4 Humana tipo salvaje	2	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 Humana tipo salvaje	1	-
28	C127S Y229C	17	43
28P	C127S Y229C, S241P	36	62
29	C127S Y229C C239S	18	44
30	C127S Y229C C242S	19	45
31	C127S Y229C C239S C242S	20	46
32	C127S K228C	21	47
33	C127S K228C C239S	22	48
34	C127S K228C C242S	23	49
35	C127S K228C C239S C242S	24	50
36	C127S S227C	25	51
37	C127S S227C C239S	26	52
38	C127S S227C C242S	27	53
39	C127S S227C C239S C242S	28	54
44	C127S G230C P238PAAA	29	55
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	37	63
45	C127S G230C P238PAAA C239S	30	56
46	C127S G230C P238PAAA C242S	31	57
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	32	58

Número de anticuerpo	Mutaciones de Cadena Pesada (Numeración Kabat)	C _H 1 dominio & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	35	61

Otros anticuerpos preparados se describen en la tabla 1 anterior.

La cadena pesada del anticuerpo 48 (Secuencia ID NO 35) se generó mediante PCR y clonación con enzimas de restricción. El producto de PCR se generó mediante un oligo directo que codifica la secuencia de la región bisagra superior y del núcleo de la IgG1 y un sitio de restricción BglII y un oligo inverso que codifica la enzima de restricción DrallI. El fragmento de PCR se dirigió después con las enzimas mencionadas anteriormente y se ligó en el vector de un solo gen hG4 que contenía la región variable apropiada.

2.- Expresión de los anticuerpos IgG4 mutados

Todo el ADN mutante se transfectó en células CHOK1 o células CHO-SXE. Se resuspendieron células (2×10^8 células/ml) en 1 ml de solución salina Earles Balance (Sigma) y se mezclaron con 400 μ g de ADN (200 μ g de ADN de cadena pesada y 200 μ g de ADN de cadena ligera kappa). Se transfirieron alícuotas de 800 μ l a cubetas de 0,4 cm (Biorad). Para un cultivo de 500 ml, se electroporaron seis cubetas bajo los siguientes parámetros: 1 ms, 9,6 Amps; 10 ms, 0 Amps; 40 ms, 3,2 Amps. Las células transfectadas se incubaron durante 24 horas, agitando a 140 rpm en un ambiente humidificado al 5% de CO₂ a 37°C y se continuaron a partir del día 2 después de la transfección a 32°C durante 10 - 13 días. El día 4 post transfección se añadieron 1,6 mls de butirato de sodio 1 M al cultivo. Una vez que las células alcanzaron una viabilidad del 40% o hasta el día 13, se recogió el sobrenadante. Los cultivos se centrifugaron durante 45 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se puso a través de un filtro Stericup de 0,22 μ M Stericup (Millipore) para purificar. Los datos en la Figura 28 muestran que los cambios en la termoestabilidad de IgG4 codificada por las mutaciones manipuladas fueron los mismos cuando la proteína se produjo a partir de células CHO-K1 o CHO-SXE.

3.- Purificación de anticuerpos IgG4 mutados

Los sobrenadantes (200-500 ml) se purificaron usando una columna Protein A de 5 ml HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, Amersham Reino Unido). Las muestras se prepararon añadiendo 1/50 del volumen del sobrenadante de Tris-HCl 2 M, pH 8,5. Las muestras se cargaron en la columna a 1 ml/min. La columna se lavó con PBS a pH 7,4. Para eluir las muestras, se aplicó citrato de sodio 0,1 M, pH 3,4 a través de la columna a 1 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones de pico se neutralizaron añadiendo 0,125 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,5 a cada uno. La detección UV se fijó a 280 nm.

4.- Caracterización de anticuerpos IgG4 mutados purificados

Análisis SDS PAGE:

El sobrenadante bruto se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se cuantificó en el OCTET. Se prepararon muestras de anticuerpos (25-30 ng) mediante la adición de las cantidades apropiadas de anticuerpo, 4 x tampón de carga (Invitrogen) y 2 μ l de NEM 100 mM. Se preparó un volumen total de 20 μ l utilizando dH₂O. Las muestras se hirvieron después durante 3 minutos a 100°C y se cargaron en un gel de Tris-Glicina de 1,5 mm y 4-20% de 15 pocillos. Los geles se hicieron funcionar a 150 V durante 1,5 horas en tampón de tanque lx. Los anticuerpos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia in seco iBlot ajustado para transferir durante 8 minutos. La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) en PBS-TM en una plataforma de agitación, seguido de incubación con un anticuerpo conjugado con HRP de conejo anti-IgG humana HRP (Jackson Immunoresearch) o anticuerpo conjugado con HRP de cabra anti-cadena ligera Kappa humana (Bethyl) durante 1 h, agitando a TA. Esto fue seguido por 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T. Las manchas se revelaron usando un kit de sustrato DAB mejorado de metal de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce).

Los resultados del análisis de transferencia de Western se muestran en las Figuras 7, 8, 9 y 10. En la figura 7-10, H significa cadena pesada y L cadena ligera, H2L2 es una molécula completa de anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras y HL es una semi-molécula que comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

La Figura 7 muestra el análisis de transferencia de Western para los anticuerpos 15, 16, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 1, 2, 3, 12 y 13. Puede verse en la Figura 7 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto para el anticuerpo 8 que muestra nada o muy poco de H2L2 debido a la presencia de ambas mutaciones de bisagra C239S y C242S. Sin embargo, el anticuerpo 8 puede formar H2L2 mediante la unión no covalente entre las cadenas pesadas. El mutante 3 también muestra poco H2L2, este mutante retiene C239 pero es incapaz de formar disulfuros de inter-cadena pesada en la bisagra, presumiblemente debido a la formación eficiente de un disulfuro entre la cisteína de la cadena ligera C-terminal (LC) y la bisagra C239. También puede observarse que los anticuerpos que comprenden la

mutación C239S pero no C242S (anticuerpos 2, 6 y 12) muestran una formación reducida de HL en comparación con anticuerpos que no comprenden ni C239S ni C242S o anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. El anticuerpo 16 que comprende la mutación S241P también muestra una formación reducida de HL. Una comparación de los mutantes 2 y 3 muestra la extensión del alcance de la cisteína C-terminal de la cadena ligera para formar un enlace disulfuro con la cadena pesada, parece que la cisteína de cadena ligera se une más eficientemente a C239 que a C242 en la cadena pesada.

La Figura 8 muestra el análisis de transferencia de Western para los anticuerpos 15, 6, 7, 8, 28, 29, 30, 31, 17, 19, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39. Se puede observar en la Figura 8 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto los anticuerpos 8, 31, 35 y 39 que no muestran o muestran muy poco H2L2 debido a la presencia de mutaciones C239S y C242S en la región bisagra y por lo tanto no forman enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Sin embargo, los anticuerpos 8, 31, 35 y 39 pueden formar H2L2 mediante la unión no covalente entre las cadenas pesadas. También puede observarse que los anticuerpos que comprenden la mutación C239S pero no C242S (anticuerpos 6, 29, 33 y 37) muestran una formación reducida de HL en comparación con anticuerpos que no comprenden ni C239S ni C242S o anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. El mutante 15 es capaz de formar un enlace disulfuro entre la cadena ligera y G230C en el CHI y los disulfuros de inter-cadena pesada resultando por lo tanto en una proteína unida completamente y unida a disulfuro. Además, una comparación de mutantes 15 (C127S G230C), 28 (C127S Y229C), 32 (C127S K228C) y 36 (C127S S227C) muestra que la posición de la cisteína introducida en la bisagra superior mejora la formación del enlace disulfuro entre LC-HC. G230 e Y229 son posiciones particularmente preferidas para introducir una cisteína. El mutante 28 (C127S Y229C) muestra un nivel bajo de HL y H2 y por lo tanto tiene una heterogeneidad de enlace disulfuro baja.

La Figura 9 muestra el análisis de transferencia de Western para los anticuerpos 15, 6, 7, 8, 44, 45, 46, 47, 17 y 19. Se puede observar en la Figura 9 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto los anticuerpos 8 y 47 que no muestran o muestran muy poco H2L2 debido a la presencia de mutaciones C239S y C242S en la región bisagra y por lo tanto no se forman enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Sin embargo, los anticuerpos 8 y 47 pueden formar H2L2 mediante la unión no covalente entre las cadenas pesadas. También puede observarse que los anticuerpos que comprenden la mutación C239S pero no C242S (anticuerpos 6 y 45) muestran una formación reducida de HL en comparación con los anticuerpos que no comprenden ni C239S ni C242S o los anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. En particular, el mutante 44 muestra que la inserción de tres aminoácidos en la bisagra superior también puede reducir la formación de HL y H2 y por lo tanto tiene niveles más bajos de heterogeneidad de disulfuro que el mutante comparable 15.

La Figura 10 muestra el análisis de transferencia de Western para los anticuerpos 48, 17, 18 y 19. Puede verse en la Figura 10, que el anticuerpo 48 muestra un buen nivel de H2L2 y muy poco HL. El mutante 48 contiene la secuencia de bisagra superior de IgG1 EPKSCDKTHT en lugar de la secuencia de bisagra superior de IgG4 junto con una mutación S241P de bisagra de núcleo. Por lo tanto, el mutante 48 tiene la secuencia de bisagra superior y central EPKSCDKTHTCPPCP. El mutante 48 muestra niveles más bajos de heterogeneidad del enlace disulfuro en comparación con el anticuerpo de IgG4 de tipo salvaje 17 y niveles bajos aproximadamente equivalentes de heterogeneidad del enlace disulfuro en comparación con el mutante 18 de IgG4 S241P y el anticuerpo 19 de IgG1 de tipo salvaje.

Ensayo de termofluor:

Las termoestabilidades de mAbs purificados se analizaron en un ensayo de termofluor utilizando SYPRO® Orange para monitorizar el proceso de despliegue térmico de proteínas. Se añadieron 5 µl de mAb a 1 mg/ml, 5 µl de 30x dye y 40 µl de PBS. Se distribuyeron diez µl de la mezcla en cuadruplicado a una placa de pocillo óptico de 384 PCR y se hizo funcionar en el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Agilent Technologies UK Ltd, Wokingham, Reino Unido). Este sistema de PCR contiene un dispositivo de calentamiento para un control de temperatura preciso ajustado entre 20°C y 99°C; un dispositivo acoplado cargado monitorea simultáneamente los cambios de fluorescencia en los pozos.

Las figuras 11, 12, 13, 14 y 15 muestran los resultados del análisis de termoestabilidad de los mutantes de anticuerpos IgG4 en comparación con los anticuerpos IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Una comparación del mutante 15 con IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) muestra un incremento en la T_m de Fab debido a la disposición de disulfuro alterada. Una comparación de los mutantes 15 y 28 muestra una mejora adicional en la T_m de Fab para el mutante 28 que comprende la mutación Y229C en comparación con el mutante 15 que comprende la mutación G230C. Una comparación del mutante 15 y 44 muestra que la T_m de Fab de un mutante G230C puede incrementarse aún más mediante la inserción de tres aminoácidos en la bisagra superior. La comparación de los mutantes 17 y 18 muestra que la mutación de bisagra intermedia S241P no aumenta la T_m de Fab a pesar de que reduce significativamente la formación de HL. El mutante 48 también muestra una T_m de Fab significativamente mejor cuando se compara tanto con IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) como con el mutante 15.

La Figura 15 muestra la clasificación general de las termoestabilidades de mutantes de IgG4 seleccionados de acuerdo con la presente invención. Los Mutantes 48, 44, 44P, 46, 45, 6, 29, 30, 28, 28P, 31, 8, 47 y 15 muestran valores de T_m de Fab significativamente más altos comparados con IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) e IgG4 S241P

de tipo salvaje (mutante 18).

Afinidad del anticuerpo:

5 La afinidad de los anticuerpos IgG4 mutantes seleccionados de la presente invención con la citoquina soluble objetivo se midió mediante Biacore™. El formato del ensayo fue la captura de las IgG en una superficie anti-Fc seguido de la titulación de la citoquina soluble.

Los resultados se muestran en la Figura 16, donde se puede ver que los anticuerpos mutantes mostraron una afinidad comparable con respecto a la citoquina soluble en comparación con los anticuerpos IgG1 e IgG4 de control de tipo salvaje.

10 El término " k_d " (s^{-1}), se refiere a la constante de velocidad de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno. Dicho valor también se conoce como el valor k_{off} .

El término " k_a " ($M^{-1} s^{-1}$), tal como se utiliza en este documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de la interacción anticuerpo-antígeno.

El término " K_D " (M) o " K_D " (pM), como se usa en este documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno.

15 **Análisis de HPLC por exclusión de tamaños (SEC):**

Aproximadamente 50 ug de anticuerpo purificado se analizó en la HPLC usando una columna S200. Los anticuerpos 1 a 19 se utilizaron para el análisis. Este resultado demuestra que se forma H2L2 no covalentemente asociado a pesar de las alteraciones a las disposiciones de DSB de una molécula de IgG4 humana.

Los resultados del análisis de HPLC se muestran en la Figura 17.

20 Longitudes de separación de bisagra superiores alternativas

Entre PP y CPSP se insertaron espaciadores de poli-alanina de entre 1 y 5 aminoácidos de longitud, es decir, en la posición indicada por '^', ESKYCPP^CPSPA. La Figura 18 muestra que el inserto de cualquier longitud de espaciador es suficiente para reducir la cantidad de formación de H2 o L2 en el mutante 15. Sin embargo, las longitudes de inserción de 3 o más aminoácidos parecían ofrecer el mayor aumento de termoestabilidad. Es de notar que una inserción de 3 aminoácidos imita más de cerca la diferencia en la longitud de bisagra superior entre IgG1 e IgG4.

Composición de aminoácidos separadora de bisagra superior alternativa

30 Con el fin de explorar si las inserciones de trialanina en ESKYCPP^CPSPA tenían propiedades especiales como separadores de bisagra superior, se probaron otras dos inserciones de tri-aminoácidos: GGG y THT. La Figura 19 muestra que tanto GGG como THT eran funcionales como regiones espaciadoras aunque los resultados sugirieron que no eran idénticas. GGG parecía ser menos capaz que AAA o THT de reducir la formación de H2 y L2. El aumento de termoestabilidad para GGG y THT no fue tan grande como el observado con AAA.

Longitud y composición de aminoácidos espaciadores de bisagra superior alternativa

35 La IgG4 tiene un espaciador de 2 aminoácidos (PP) entre la cisteína inter-cadena CHI y la cisteína de la bisagra del primer núcleo, mientras que la IgG1 tiene un espaciador DKTHT de 5 aminoácidos. Se construyeron cuatro mutantes (68, 67, 66 y 56) para permitir una comparación frente al mutante 15 (ESKYCPPCPSPA). En primer lugar, el separador de PP de IgG4 se reemplazó con un espaciador DK de igual longitud que el encontrado en IgG1; el mutante 68 (ESKYCDKCPSPA) y luego por un incremento de aminoácidos para imitar el espaciador de bisagra superior IgG1:

40 el mutante 67 (ESKYCDKTCPSCP)

el mutante 66 (ESKYCDKTHCPSCP)

el mutante 56 (ESKYCDKHTCPSCP).

45 Los datos en la Figura 21 sugieren que el cambio más importante es de PP a DK, lo que resultó en una reducción en la formación de H2, H y L en relación con el mutante 15. El aumento de longitudes de IgG1 adicional como la inserción espaciadora (T, TH y THT) parecía producir una reducción incremental mínima en H2, pero puede haber dado como resultado un aumento incremental adicional en la formación de HL. Dado que los mutantes 68, 67, 66 y 56 contienen una secuencia de bisagra de núcleo CPSC, el incremento en la formación de HL puede ser evidencia de que los espaciadores sean más eficaces en aislar las cisteínas del enlace disulfuro de intercadena LC-HC lejos de las cisteínas bisagra de núcleo que son, por lo tanto, propensas a la formación de enlaces disulfuro intramoleculares.

50

Los datos de la figura 22 sugieren que DK es preferible a PP como una elección de espaciador de 2 aminoácidos en términos de reducción de la heterogeneidad de la isoforma de disulfuro, comparar los mutantes 15 (ESKYCPPCPSCP) y 68 (ESKYCDKCPSCP) y los mutantes 55 (ESKYCPPTHTCPSCP) y 56 (ESKYCDKHTCPSCP). Se sabe que los motivos de poli-prolina cortos tales como PP son capaces de codificar para cierto nivel de potencial de giro de hélice lo que puede resultar en una yuxtaposición local de LC-HC y cisteínas de bisagra de núcleo. Este efecto local parece ser mejor superado por un AAA adicional como se ve en el mutante 44 (ESKYCPPAAACPSCP). Ninguno de los mutantes 68, 55, 56, 44 ó 69 parecía tener termostabilidades significativamente diferentes.

Influencia de la composición de la secuencia de bisagra superior no-espaciadora

10 Con el fin de comprender la influencia de la composición de secuencia de la secuencia de bisagra superior N-terminal del inter LC-HC CHI cisteína (ESKY en IgG4 y EPKS en IgG1) todas las permutaciones de mutante se realizaron en el contexto de mutante 15 (ESKYCPPCPSCP). Los datos de la Figura 23 muestran que en el contexto de un espaciador de PP, ninguna de las permutaciones de la composición de bisagra superior parecía afectar significativamente la heterogeneidad de la isoforma de disulfuro. Los datos mostrados anteriormente sugieren que esta falta de efecto se debe principalmente a que las proteínas contienen un espaciador de PP corto y un motivo de bisagra de núcleo capaz de la formación del enlace disulfuro intramolecular. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la termoestabilidad. Ambas de las secuencias evolucionadas naturalmente; ESKP (83,8°C) y EPKS (80,6°C) eran más estables que cualquiera de las secuencias híbridas; EPKY (76,3°C) y EPKS (79,0°C). Los datos muestran que la secuencia de EPKS de IgG1 es más preferible.

20 Con el fin de comprender la importancia de los motivos de bisagra superior de ESKY o EPKS en el contexto de la región de espaciador DKHT más preferible, se realizaron todas las permutaciones. Los datos de la Figura 24 muestran que el motivo ESKY de IgG4 natural (mutante 56 ESKYCDKHTCPSCP) es el más susceptible a la heterogeneidad de la isoforma de disulfuro. Los datos de la Figura 24 confirman que la secuencia de bisagra superior natural de IgG1 (el mutante 65 (EPKSCDKHTCPSCP) tiene un potencial mínimo para la heterogeneidad de la isoforma de disulfuro y tiene una alta termoestabilidad.

Influencia de la bisagra de núcleo Ser a Pro swap

30 Se mutó un mutante 48 más preferido (EPKSCDKHTCPPCP) para reintroducir la bisagra Ser natural de IgG4 (Ser²⁴¹ por la numeración de Kabat), dando como resultado el mutante 65 (EPKSCDKHTCPSCP). Los datos de la Figura 20 confirman que el mutante 48 tiene niveles muy reducidos de H2, HL, H y L comparados con el mutante 15 (ESKYCPPCPSCP) y una termoestabilidad muy significativamente aumentada. La reintroducción de la bisagra de núcleo Ser²⁴¹ (mutante 65) no afectó a la termoestabilidad relativa al mutante 48, pero sí resultó en la reaparición de niveles significativos de HL. Es de notar que el mutante 65 todavía tenía menos H2, H y L que el mutante 15 que ilustra la importancia de la longitud y composición de la secuencia de la bisagra superior con respecto a la homogeneidad de la isoforma de disulfuro.

35 Ensayo de la función efectora del anticuerpo por lisis celular

Las células diana que expresan el antígeno de superficie celular tenían sus contenidos intracelulares marcados por incubación con el ligando BADTA que potenciaba la fluorescencia. BADTA se convierte dentro de la célula en un ligando hidrófilo, TDA. Las células marcadas se incuban con anticuerpo y PBMC (células mononucleares de sangre periférica) como agentes líticos. Después de la lisis de células, en este ejemplo por ADCC, se libera TDA y forma un quelato EuTDA fluorescente y estable cuando se añade Europium a cultivos celulares. En esencia, el marcaje con BADTA de los contenidos celulares permite una cuantificación de la lisis celular. La lisis celular a su vez proporciona una medida de la presencia de funciones efectoras en una IgG. Las Figuras 25 y 26 intentan lisar células con IgG4 por ADCC. Se hizo un análogo del anticuerpo de Herceptin (trastuzumab) tanto como IgG1 de tipo salvaje como IgG4 de tipo salvaje. El antígeno Her-2 para Herceptin se expresa en células MCF7 y SKBR3. También se generaron mutantes del análogo de Herceptin de IgG y se purificó IgG para su uso en el ensayo de ADCC. Se sabe que IgG4 tiene una capacidad muy baja para realizar ADCC como se confirma por la diferencia entre la IgG1 de tipo salvaje (wt) y la IgG4 de tipo salvaje (wt). Esta falta de potencial ADCC innato no fue afectada por ninguno de los 4 mutantes IgG4 ensayados. En particular, se incluyen los mutantes 28, 44 y 48 que tienen disposiciones de enlace disulfuro de LC-HC intercadena alteradas y más notablemente el mutante 48 (EPKSCDKHTCPPCP) que contiene los motivos de bisagra superior y central de IgG1. Por lo tanto, estos datos muestran que los mutantes descritos no obtienen funciones efectoras mediante el uso de secuencias de bisagra superior y central de IgG1.

Aplicabilidad amplia de mutantes a anticuerpos IgG4.

55 Todos los datos descritos hasta ahora son para un anticuerpo IgG4 específico de la UCB, Ab 410. Con el fin de demostrar que las mejoras en la homogeneidad de la isoforma disulfuro y la termoestabilidad no eran únicas para la estructura/estabilidad codificada de la región variable de esta IgG, se generaron ejemplares de otras IgG4. La información de secuencia disponible públicamente se usó para crear análogos de IgG4 de tres IgG de importancia industrial: Trastuzumab (Herceptin), Natalizumab (Tysabri) y Tocilizumab (Actemra). Colectivamente, los datos mostrados en las Figuras 28 a 33 muestran que el rendimiento relativo de los mutantes clave de IgG4 son muy

similares en todos los ejemplares de IgG4, tanto en términos de homogeneidad de isoforma de disulfuro como de termoestabilidad relativa. Las estabildades absolutas de cada ejemplar difieren unas de otras de una manera esperada de las observaciones publicadas anteriores sobre las diferentes estabildades inherentes de las IgG. Estos datos sugieren que los mutantes descritos son capaces de mejorar la homogeneidad de la isoforma disulfuro y el aumento de la termoestabilidad en todas las moléculas de IgG4.

5

Efecto de los mutantes de IgG4 en consideraciones prácticas: expresión y célula huésped

Los mutantes descritos mejoraron la homogeneidad de la isoforma de disulfuro y aumentaron la termoestabilidad en el rango de las moléculas de IgG4. Los datos de la Figura 27 muestran que estos mutantes no afectan negativamente a la expresión de IgG4. Los datos de expresión mostrados son la expresión media de cada mutante expresado transitoriamente a partir de células CHO para cada una de las 4 especificidades de antígeno descritas; Ab410, y análogos de Trastuzumab, Natalizumab y Tocilizumab. Estos datos sugieren que la estructura del disulfuro de inter-cadena de la cadena Fab y las secuencias de bisagra superior y central no son determinantes primarios del rendimiento de células CHO. Los datos de la Figura 31 muestran que la termoestabilidad de Ab410 es la misma si los mutantes se expresan en células CHO-K1 o CHO-SXE. Estos datos apoyan que las mutaciones a la estructura del disulfuro de la inter-cadena del brazo Fab de IgG y las secuencias de bisagra superior y de núcleo son los determinantes primarios de termoestabilidad mejorada.

10

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio CH1 y una región bisagra, en el que en cada cadena pesada:
- 5 a. la cisteína inter-cadena en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, en el dominio C_H1 se sustituye con otro aminoácido; y
- b. uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra superior está sustituido con cisteína.
- 2.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior que está sustituida con cisteína se selecciona entre 227, 228, 229 y 230, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- 10 3.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la glicina en la posición 230, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, está sustituida con cisteína.
- 4.- El anticuerpo según la reivindicación 2, en el que la tirosina en la posición 229, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, está sustituida con cisteína.
- 15 5.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la lisina en la posición 228, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, está sustituida con cisteína.
- 6.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la serina en la posición 227, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, está sustituida con cisteína.
- 7.- El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cisteína en la posición 239 y la cisteína en la posición 242, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la cadena pesada están sustituidas con otro aminoácido.
- 20 8.- El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cisteína en la posición 239, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido.
- 9.- El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cisteína en la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la cadena pesada se sustituye con otro aminoácido.
- 25 10.- Un anticuerpo de la clase IgG4 que comprende al menos una cadena pesada que comprende un dominio CH1 y una región bisagra, en el que en cada cadena pesada:
- a. la cisteína inter-cadena en la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, está sustituida con otro aminoácido; y
- 30 b. la cisteína en la posición 239 o la cisteína en la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración Kabat, está sustituida con otro aminoácido.
- 11.- El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la cisteína en la posición 239 y/o la cisteína en la posición 242 está sustituida por un aminoácido no tiol.
- 12.- El anticuerpo según la reivindicación 11, en el que el aminoácido que no contiene tiol es serina.
- 35 13.- El anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la cisteína en la posición 127 está sustituida por un aminoácido no tiol.
- 14.- El anticuerpo según la reivindicación 13, en el que el aminoácido que no contiene tiol es serina.
- 15.- El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cadena pesada está mutada para insertar tres aminoácidos entre los aminoácidos 226-243, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- 40 16.- El anticuerpo según la reivindicación 15, en el que la cadena pesada se muta para insertar tres aminoácidos entre las posiciones 238 y 239, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- 17.- El anticuerpo según la reivindicación 16, en el que se insertan tres alaninas entre las posiciones 238 y 239, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- 45 18.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16, en el que una treonina, una histidina y una teronina adicional se insertan entre las posiciones 238 y 239, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.
- 19.- El anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la serina en la posición 241,

numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, está sustituida con prolina.

- 5 20.- El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la glicina en la posición 230 está sustituida con cisteína, la serina en la posición 227 está sustituida con prolina, la tirosina en la posición 229 está sustituida con serina, la prolina en la posición 237 está sustituida con ácido aspártico, la prolina en la posición 238 está sustituida con lisina, la secuencia de aminoácidos treonina-histidina-treonina se inserta entre las posiciones 238 y 239 y la serina en la posición 241 se sustituye con prolina.
- 21.- El anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la cadena pesada comprende un dominio CH2 y un dominio CH3.
- 10 22.- El anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y como se define en cualquier reivindicación precedente.
- 23.- El anticuerpo según la reivindicación 22, en el que las cadenas pesadas son idénticas.
- 24.- El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que la cadena pesada o cada cadena pesada comprende una región bisagra superior y una región central de 12 a 17 aminoácidos de longitud.
- 15 25.- El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la parte superior de bisagra y región de núcleo es de 15 aminoácidos de longitud.
- 26.- Un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
- 27.- Una célula huésped que comprende un vector como se define en la reivindicación 26.
- 20 28.- Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Figura 1a

CH1 de IgG1 tipo salvaje y bisagra

(A) STKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALFSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV

DKKV (E) PKSCDKTHITCPPCPAPELGGP

(SEQ ID NO:1)

CH1 de IgG4 tipo salvaje y bisagra

(A) STKGPSVFFPLAPCSRSSTSESTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALFSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV

DKRV (E) SKYGPCCPSCPAPPEFLGGP

(SEQ ID NO:2)

Cadena ligera constante kappa de IgG1 tipo salvaje

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSP

VTKSENREGC (SEQ ID NO:66)

Figura 1b

Cadena ligera κ humana	C_L FNRGEC (SEQ ID NO:3)				
Cadena pesada IgGy1 humana	C_{H1} (N-term) LAPSSKSTS (SEQ ID NO:4)	SUPERIOR EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:5)	NÚCLEO CPPCP	INFERIOR APELLGGP	
IgGy2 humana	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:6)	ERK (SEQ ID NO:7)	CCVECPPCP	APPVA GP	
IgGy3 humana	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:8)	ELKTLPLGLTHT (SEQ ID NO:9)	CPRCP (EPKSCDIPPPCPRCP) ₃	APELLGGP	
IgGy4 humana	TAPCSRSTS ↑ C127 (SEQ ID NO:10)	FISKYGPP ↑ G230 (SEQ ID NO:11)	CPSCP ↑ C239 ↑ C242	APRFTGGP	
Cadena pesada IgD humana	C_{H1} (N-term) LISGRHPK (SEQ ID NO:67)	Bisagra (E) SPKAQASVPTAQPAEGLAKATTAPATIRNT (SEQ ID NO:68)			
Cadena pesada IgM humana	C_{H1} (N-term) LVSCENSPS (SEQ ID NO:69)	C_{H1} (C-term) EKNVPLP (SEQ ID NO:70)		C_{H2} (N-term) (V) IAE_PPKVSV (SEQ ID NO:71)	

Figura 2a

		BISAGRA															
CHI		216	217	218	221	233	234	235	236	223	224	225	226	227	228	229	230
Numeración EU para IgG1	131																
Numeración Kabat para IgG1	127	226	227	228	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	
Numeración IMG1 para IgG1	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
residuos IqG1 wt	S	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	
Numeración EU para IgG4	131	216	217	218	219	220	224	225	-	-	-	226	227	228	229	230	
Numeración Kabat para IgG4	127	226	227	228	229	230	237	238	-	-	-	239	240	241	242	243	
Numeración IMG1 para IgG4	10	1	2	3	4	5	6	7				8	9	10	11	12	
residuos IqG4 wt	C	E	S	K	Y	G	P	P	-	-	-	C	P	S	C	P	
Mutaciones a IqG4	S		C or P	C	C or S	C	D or A	K or A	A or T or G	A or H or G	A or T or G	S		P	S		

Figura 2b

	CH1	BISAGRA						
Numeración Kabat	127	226	227	228	229	230	232	233
Numeración IMGT para IgG3	10	1	2	3	4	5	6	7
residuos IgG3 wt	C	E	L	K	T	P	L	G
Mutaciones a IgG3	S	C	C	C	C	C	C	C

Figura 2c

	CH1					CH2		
Numeración Kabat para IgM	127	223	223A	223B	223C	243G	243H	243I
Numeración IMGT para IgM	10	121	122	123	124	1.5	1.4	1.3
residuos IgM wt	C	V	P	L	P	V	I	A
Mutaciones a IgM	S	C	C	C	C	C	C	C

Figura 2d

	CH1	Bisagra						
Numeración Kabat para IgD	128	227	228	229	230	231	232	233
Numeración IMGT para IgD	11	1	2	3	4	5	6	7
residuos IgD wt	C	E	S	P	K	A	Q	A
Mutaciones a IgD	S	C	C	C	C	C	C	C

Figura 3a

Mutaciones a HC IgG4	ANTICUERPOS															
	G4	G1	1	2	3	6	7	8	12	13	15	16				
C127S			•	•	•	•	•	•			•	•				
G230C						•	•	•			•	•				
C239S				•		•	•	•	•							
S241P												•				
C242S					•		•	•		•						

Figura 3b

Posición de HC Cys	ANTICUERPOS															
	G4	G1	1	2	3	6	7	8	12	13	15	16				
127	LC								LC	LC						
230 (G4)		LC				LC		LC			LC	LC				
233 (G1)							LC									
239	HC	LC or HC			LC		HC			HC	HC or LC	HC or LC				
242	HC	LC or HC		LC		HC			HC		HC or LC	HC or LC				

Figura 4a

Mutaciones a G4	G4	G1	ANTICUERPOS																
			28	28P	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47
C127S		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
S227C																			
K228C																			
Y229C		•	•	•	•														
G230C																			
P238PAAA																			
C239S				•	•									•					
S241P																			
C242S																			

Figura 4b

		ANTICUERPOS																	
Posición a	G4	G1	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47	
HC Cys	LC																		
227											LC or HC								
228							LC or HC	LC	LC	LC		LC	LC						
229 G4)				LC	LC	LC													
230 (G4)		LC													LC or HC	LC	LC		LC
233 (G1)		HC	HC or LC		HC		HC or LC		HC		HC or LC		HC		HC or LC		HC		
239	HC	HC	HC or LC				HC or LC				HC or LC		HC		HC or LC		HC		
242	HC	HC	HC or LC	HC			HC or LC	HC			HC or LC	HC			HC or LC	HC			

Figura 5

(Ab 6) (SEQ ID NO:12)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PSPSCPAPEFLGGP

(Ab 7) (SEQ ID NO:13)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PCPSSPAPEFLGGP

(Ab 8) (SEQ ID NO:14)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PSPSSPAPEFLGGP

(Ab 15) (SEQ ID NO:15)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PCPSCPAPEFLGGP

(Ab 16) (SEQ ID NO:16)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PCPSCPAPEFLGGP

(Ab 28) (SEQ ID NO:17)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKCG?PCPSCPAPEFLGGP

(Ab 29) (SEQ ID NO:18)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHT~~FP~~AVI~~QSSGLYSLSSVVTV~~PSSSL~~GTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKCG?PSPSCPAPEFLGGP

- (Ab 30) (SEQ ID NO:19)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSSPAPEFLLGGP
- (Ab 31) (SEQ ID NO:20)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPPAPEFLLGGP
- (Ab 32) (SEQ ID NO:21)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSCPAPEFLLGGP
- (Ab 33) (SEQ ID NO:22)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPPSPCPPAPEFLLGGP
- (Ab 34) (SEQ ID NO:23)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSSPAPEFLLGGP
- (Ab 35) (SEQ ID NO:24)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPPSPCPPAPEFLLGGP
- (Ab 36) (SEQ ID NO:25)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSCPAPEFLLGGP
- (Ab 37) (SEQ ID NO:26)**
 (A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPPSPCPPAPEFLLGGP

- (Ab 38) (SEQ ID NO:27)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYG?PCPSSPAPEFLGGP
- (Ab 39) (SEQ ID NO:28)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYG?PSPSSPAPEFTLGGP
- (Ab 44) (SEQ ID NO:29)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PAAACPSCPAPPEFLGGP
- (Ab 45) (SEQ ID NO:30)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PAAAASPSCPAPPEFLGGP
- (Ab 46) (SEQ ID NO:31)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PAAACPSSPAPEFLGGP
- (Ab 47) (SEQ ID NO:32)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYC?PAAAASPSCPAPPEFLGGP
- (Ab 2) (SEQ ID NO:33)**
 (A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYG?PSPSCPAPPEFLGGP

(Ab 3) (SEQ ID NO:34)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 48) (SEQ ID NO:35)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGP

(Ab 28P) (SEQ ID NO:36)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCP²CPAPEFLGGP

(Ab 44P) (SEQ ID NO:37)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYC²PPAAA²CPAPEFLGGP

Figura 6

IgG4 CH2 and CH3: (SEQ ID NO:64)

SVFLFPKPKD^TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVINA^KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

IgG4 CH2 IgG1 CH3: (SEQ ID NO:65)

SVFLFPKPKD^TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVINA^KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLSPGK

(Ab 6) (SEQ ID NO:38)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT^KTKTYTCNV^DHKPSN^TKVDKRV (E) SKYCP^PSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD^TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVINA^KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Ab 7) (SEQ ID NO:39)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT^KTKTYTCNV^DHKPSN^TKVDKRV (E) SKYCP^PCPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD^TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVINA^KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Ab 8) (SEQ ID NO:40)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT^KTKTYTCNV^DHKPSN^TKVDKRV (E) SKYCP^PSPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD^TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVINA^KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Ab 15) (SEQ ID NO:41)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYSLSSVVTPSSSLG~~TKTYTCNVDE
KPSNTKVKDRV (E) SKYCPPCPCPAP~~EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSD~~EDPEVQFNWYVDGVEVHN~~AKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQ~~VYTI~~PPS~~QEE~~MIK~~NQVSL~~CLVKG~~GFYPSD~~IAVEWES
NGQPENNYK~~TTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MEALHNHYTQ~~KLSLSL~~SLGK

(Ab 16) (SEQ ID NO:42)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYSLSSVVTPSSSLG~~TKTYTCNVDE
KPSNTKVKDRV (E) SKYCPPCPCPAP~~EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSD~~EDPEVQFNWYVDGVEVHN~~AKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQ~~VYTI~~PPS~~QEE~~MIK~~NQVSL~~CLVKG~~GFYPSD~~IAVEWES
NGQPENNYK~~TTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MEALHNHYTQ~~KLSLSL~~SLGK

(Ab 28) (SEQ ID NO:43)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYSLSSVVTPSSSLG~~TKTYTCNVDE
KPSNTKVKDRV (E) SKCGPPCPCPAP~~EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSD~~EDPEVQFNWYVDGVEVHN~~AKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQ~~VYTI~~PPS~~QEE~~MIK~~NQVSL~~CLVKG~~GFYPSD~~IAVEWES
NGQPENNYK~~TTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MEALHNHYTQ~~KLSLSL~~SLGK

(Ab 29) (SEQ ID NO:44)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYSLSSVVTPSSSLG~~TKTYTCNVDE
KPSNTKVKDRV (E) SKCGPPCPCPAP~~EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSD~~EDPEVQFNWYVDGVEVHN~~AKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQ~~VYTI~~PPS~~QEE~~MIK~~NQVSL~~CLVKG~~GFYPSD~~IAVEWES
NGQPENNYK~~TTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MEALHNHYTQ~~KLSLSL~~SLGK

(Ab 30) (SEQ ID NO:45)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYSLSSVVTPSSSLG~~TKTYTCNVDE
KPSNTKVKDRV (E) SKCGPPCPCPAP~~EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSD~~EDPEVQFNWYVDGVEVHN~~AKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQD~~WLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQ~~VYTI~~PPS~~QEE~~MIK~~NQVSL~~CLVKG~~GFYPSD~~IAVEWES
NGQPENNYK~~TTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MEALHNHYTQ~~KLSLSL~~SLGK

(Ab 31) (SEQ ID NO:46)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDFE
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEIMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 32) (SEQ ID NO:47)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDFE
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEIMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 33) (SEQ ID NO:48)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDFE
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEIMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 34) (SEQ ID NO:49)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDFE
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEIMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 35) (SEQ ID NO:50)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFFPAVIQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTRKTYTCNVDFE
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEIMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 36) (SEQ ID NO:51)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYGGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 37) (SEQ ID NO:52)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYGGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 38) (SEQ ID NO:53)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYGGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 39) (SEQ ID NO:54)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) CKYGGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 44) (SEQ ID NO:55)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTI PPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 45) (SEQ ID NO:56)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYCP~~PAAASPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 46) (SEQ ID NO:57)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYCP~~PAAACPPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 47) (SEQ ID NO:58)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYCP~~PAAASPPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 2) (SEQ ID NO:59)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYGP~~PPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
NGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 3) (SEQ ID NO:60)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFFPAVIQSSGLYLS~~SSVVTVPSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYGP~~PCPPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
NGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 48) (SEQ ID NO:61)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFP~~PAVIQSSGLYLS~~SSVTV~~PSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKHTHTCPPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVDV~~SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYR~~VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVY~~ITLPPSQEEMTKNQVSLTCLLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPENNYKTT~~PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MHEALHNH~~Y~~TQKSLSLGK

(Ab 28P) (SEQ ID NO:62)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFP~~PAVIQSSGLYLS~~SSVTV~~PSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVDV~~SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYR~~VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVY~~ITLPPSQEEMTKNQVSLTCLLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPENNYKTT~~PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MHEALHNH~~Y~~TQKSLSLGK

(Ab 44P) (SEQ ID NO:63)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GVHTFP~~PAVIQSSGLYLS~~SSVTV~~PSSSLGTRKTYTCNVDE
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMI~~SRTPEVTCVVDV~~SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYR~~VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI~~SKAKGQPREPQVY~~ITLPPSQEEMTKNQVSLTCLLVKGFYPSDIAVE~~
WESNGQPENNYKTT~~PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MHEALHNH~~Y~~TQKSLSLGK

Figura 7

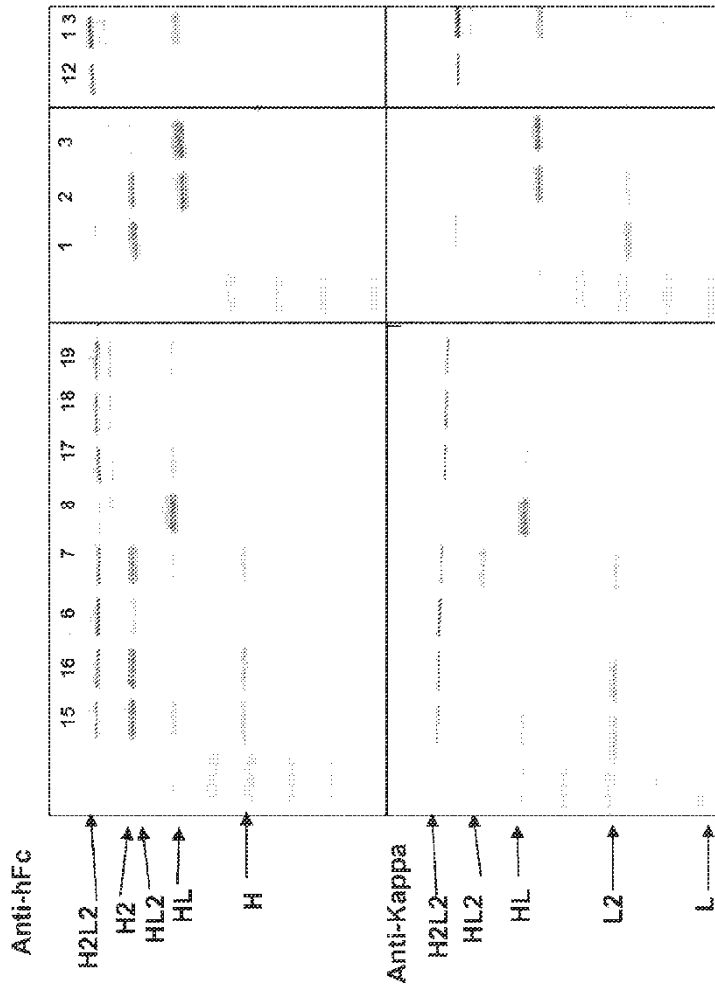


Figura 8

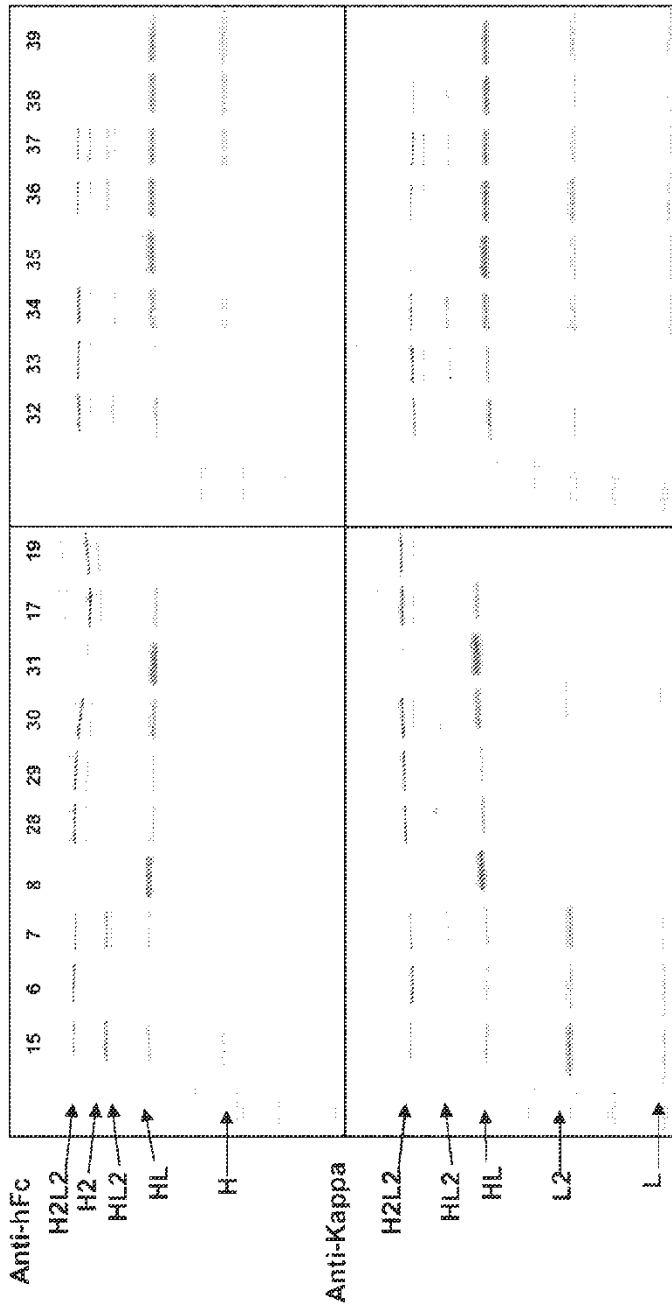


Figura 9

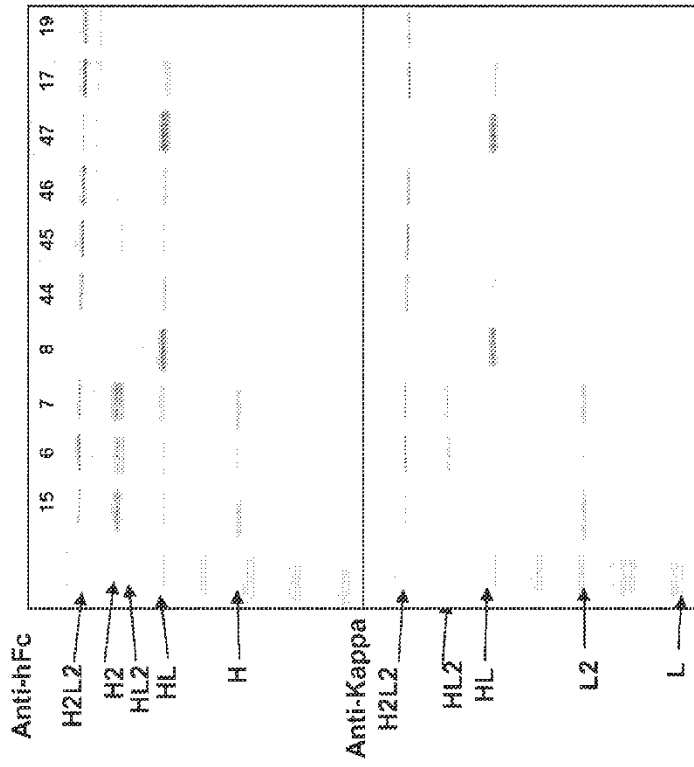
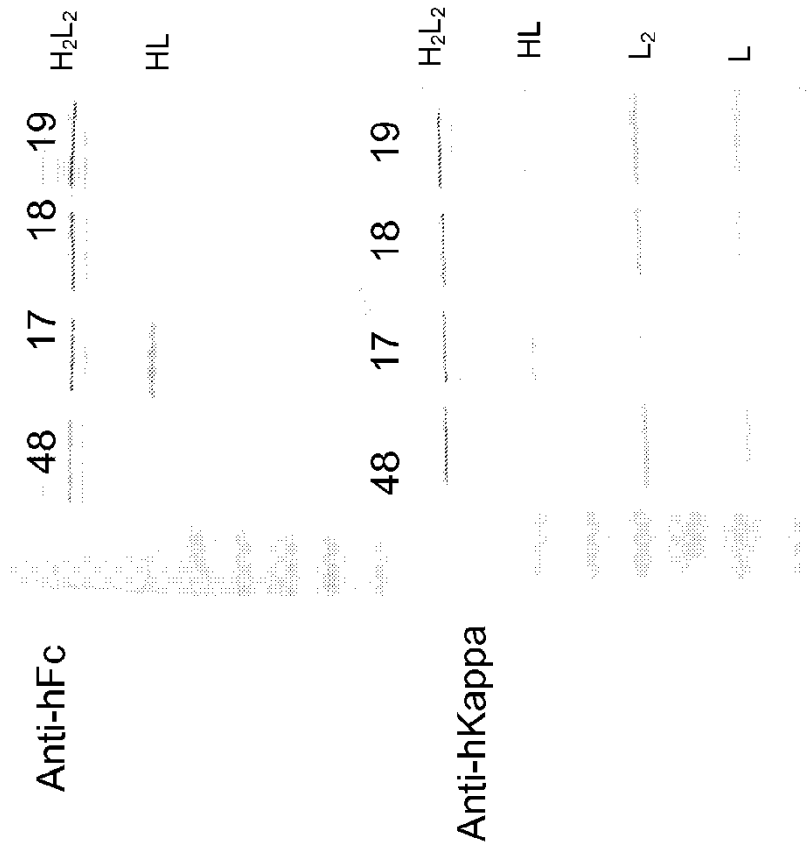


Figura 10



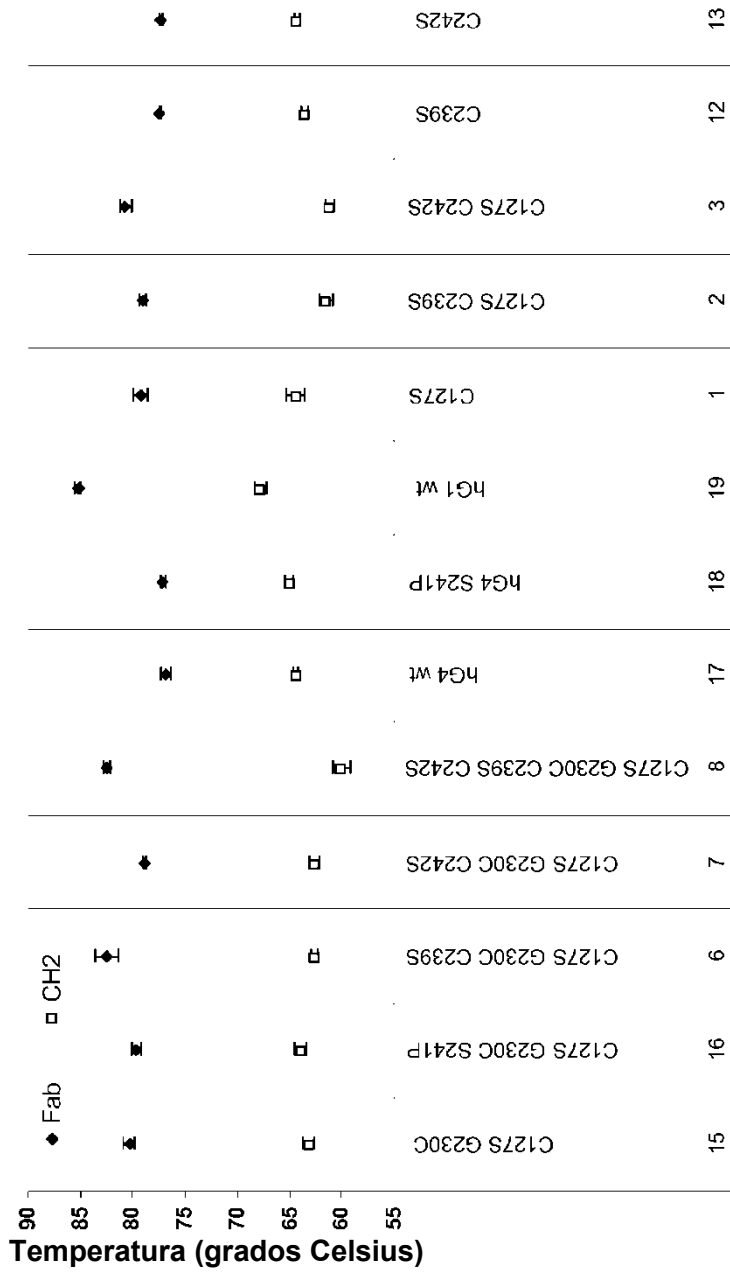


Figura 11

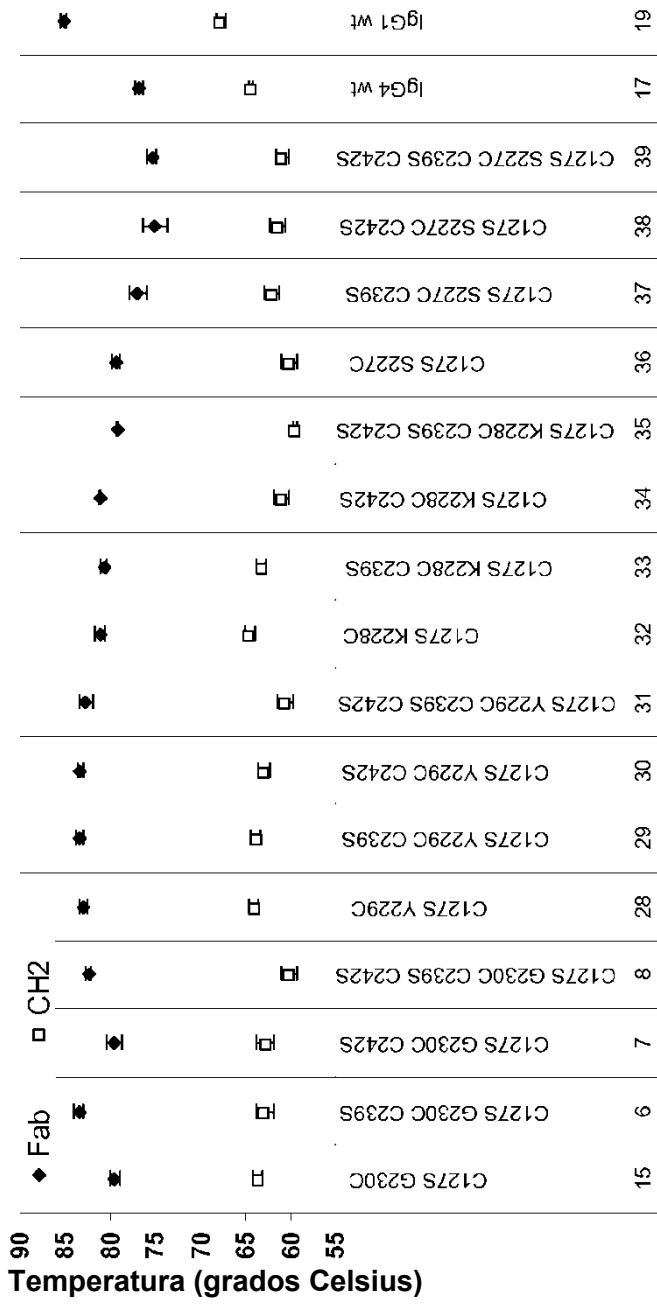
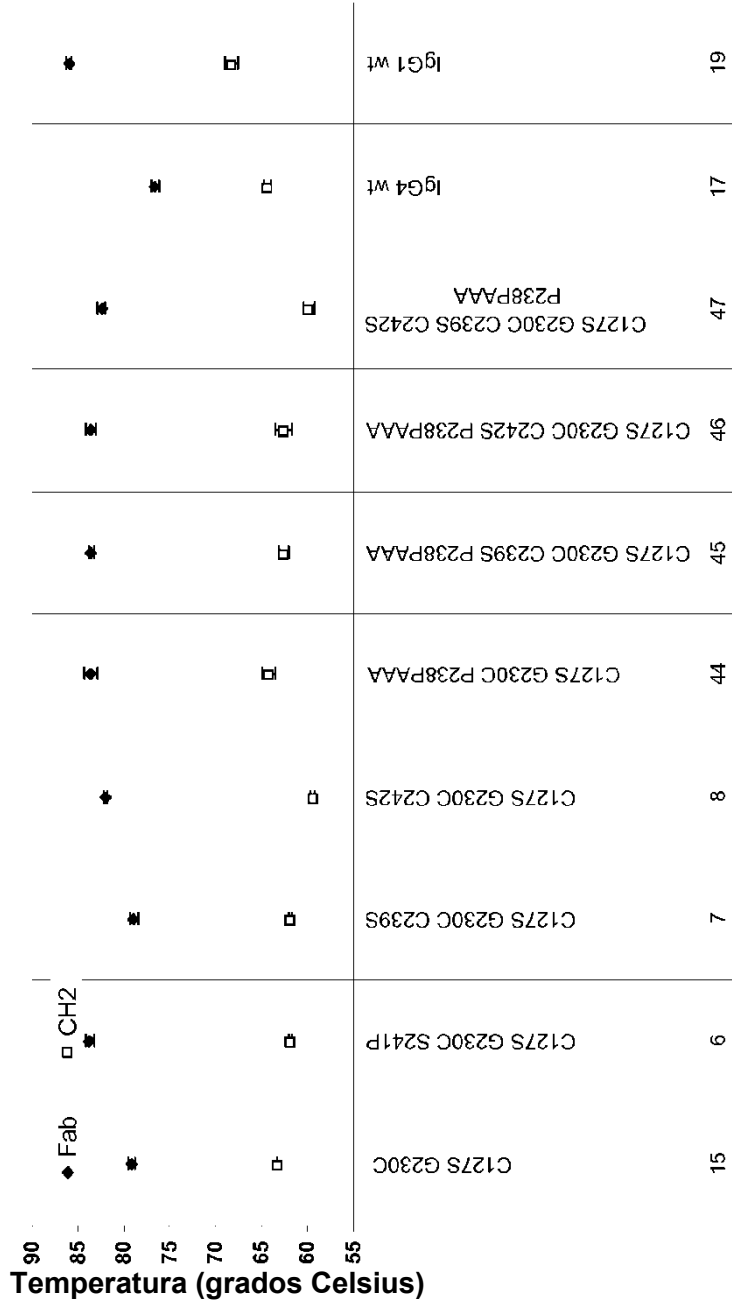


Figura 12

Figura 13



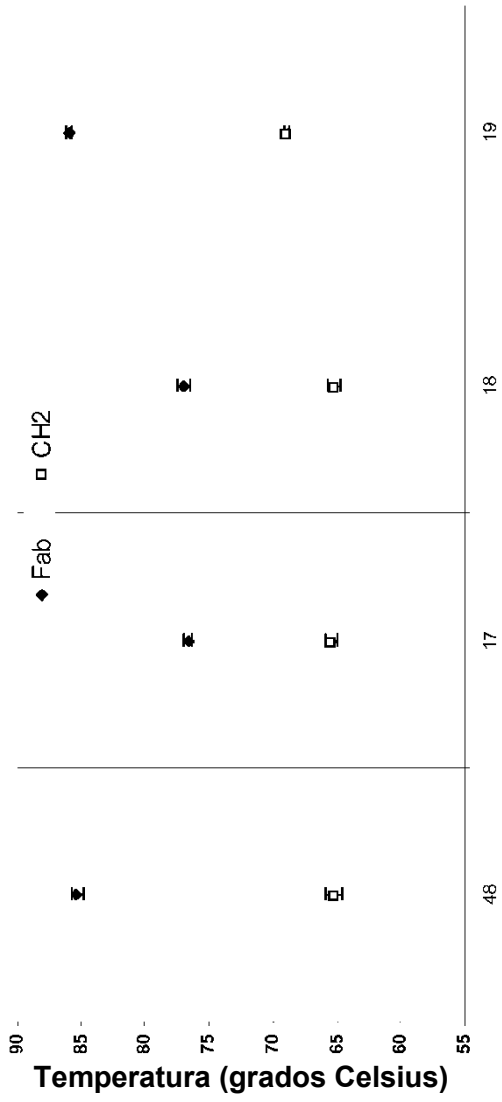


Figura 14

Figura 15

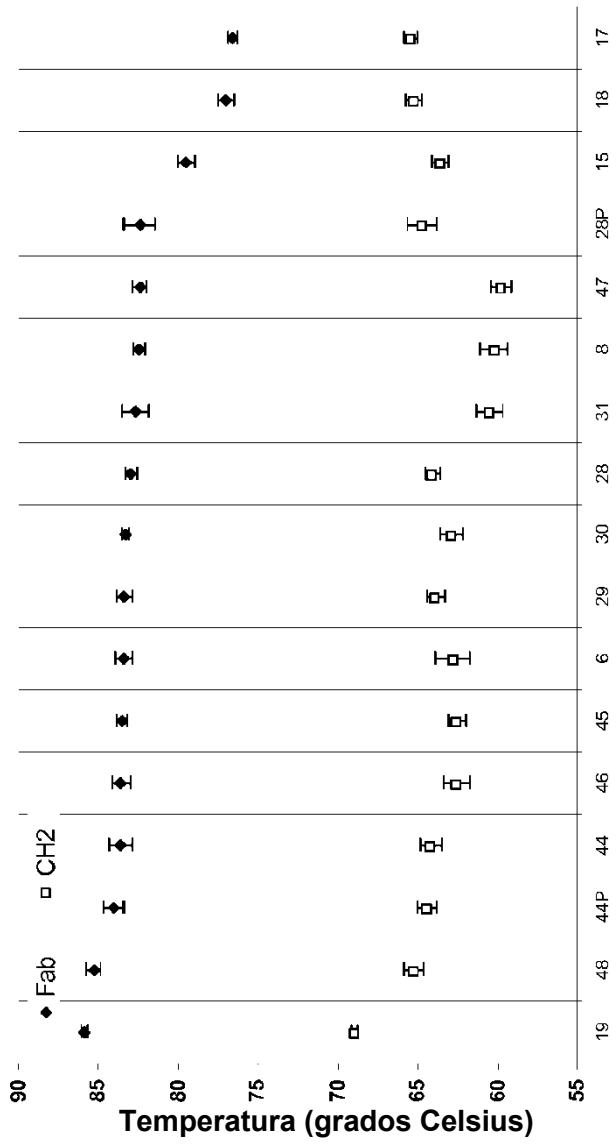


Figura 16

Anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	KD (pM)
Control				
17 (hg4 wt)	3.03E+06	2.41E-04	7.95E-11	80
18 (hg4 S241P)	2.65E+06	2.51E-04	9.47E-11	95
19 (hg1 wt)	2.77E+06	3.54E-04	1.28E-10	128
17 (hg4 wt)	2.87E+06	3.26E-04	1.14E-10	114
Mutantes				
15 (C127S G233C)	3.13E+06	2.73E-04	8.72E-11	87
16 (C127S G233C S241P)	2.83E+06	3.54E-04	1.25E-10	125
6 (C127S G233C C239S)	2.89E+06	3.32E-04	1.15E-10	115
7 (C127S G233C C242S)	2.98E+06	2.95E-04	9.90E-11	99
8 (C127S G233C C239S C242S)	2.71E+06	2.62E-04	9.67E-11	97

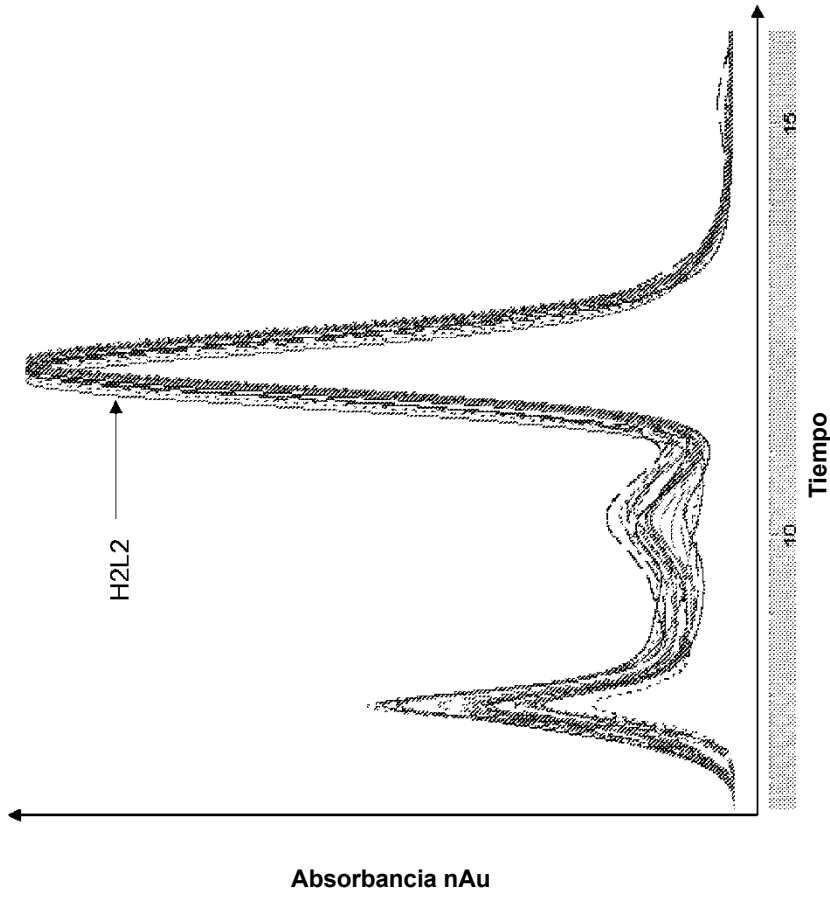


Figura 17

Figura 18

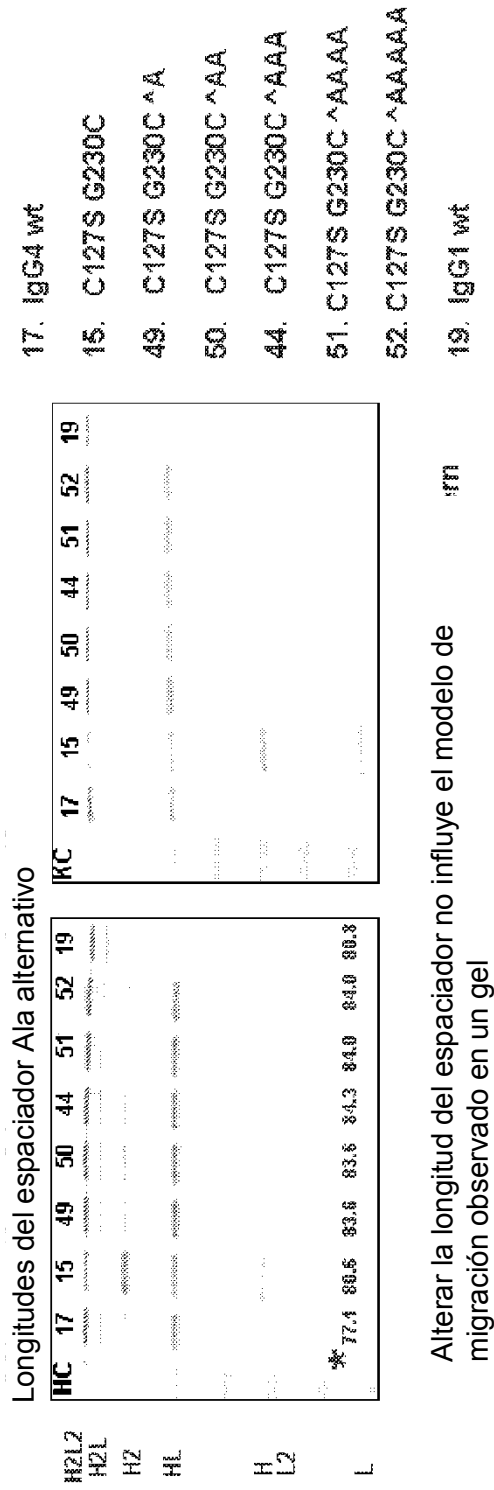
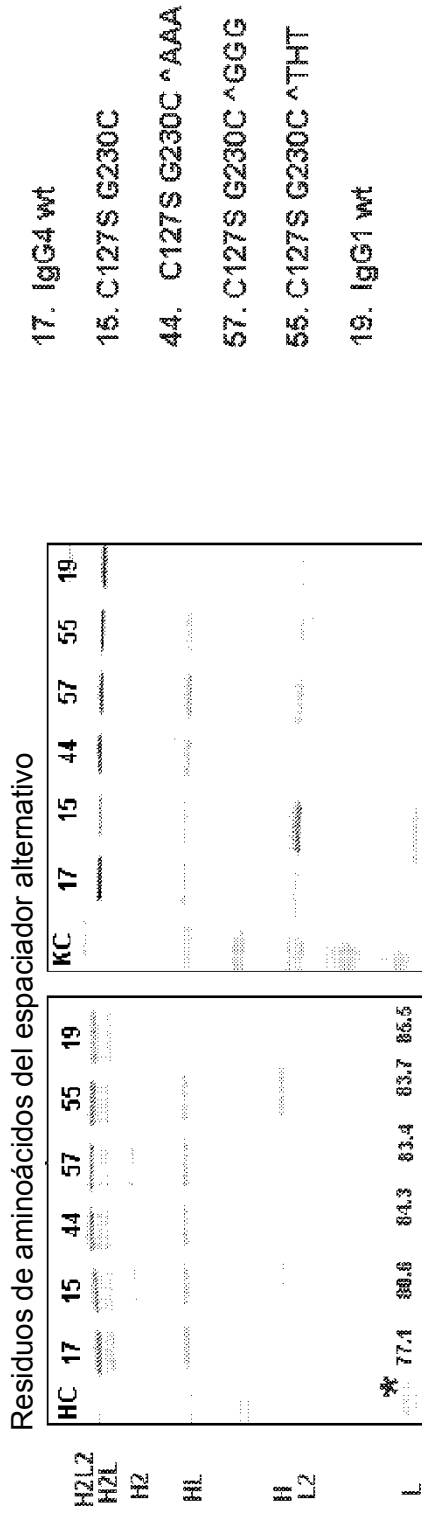


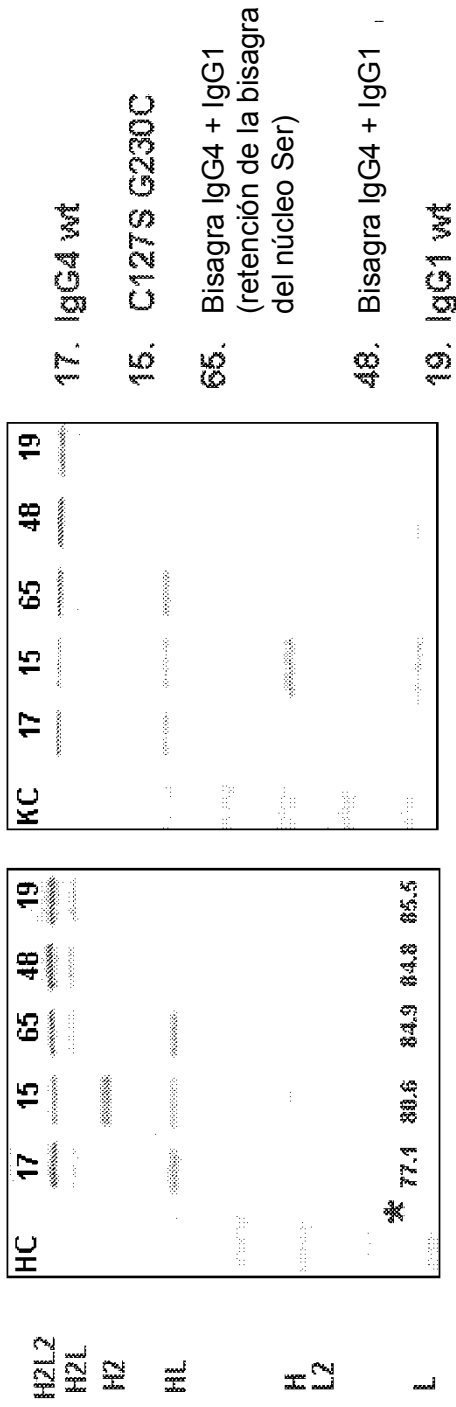
Figura 19



Modelo de migración similar para los residuos del espaciador alternativo comparado con AAA, con una ligera diferencia en las intensidades de banda

* Estabilidad Fab °C

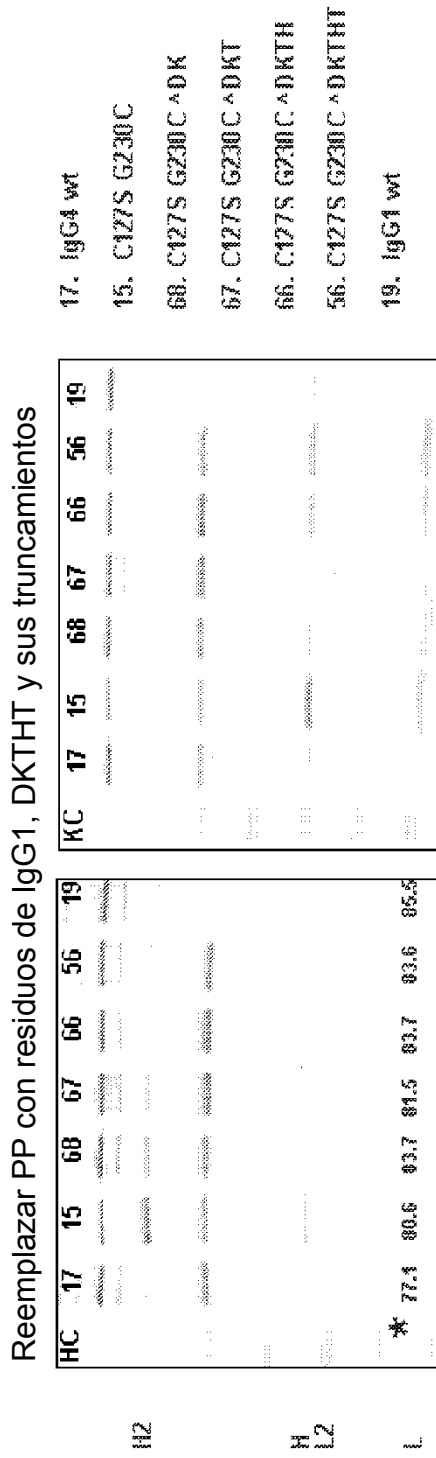
Figura 20



Re-introducción de la Ser a la bisagra del núcleo (mut 65) da como resultado el HL observado en SDS PAGE como en IgG4 wt, mientras retiene la estabilidad de Fab vista para el mutante 48

* Estabilidad Fab °C

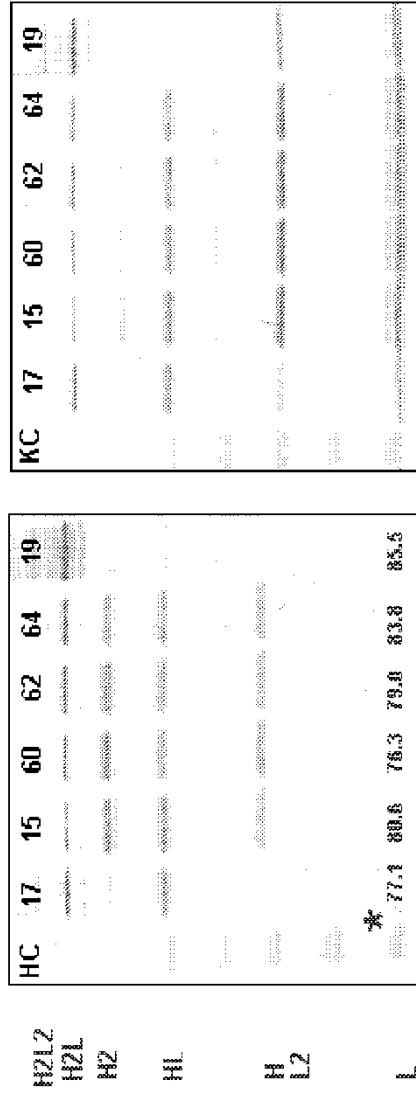
Figura 21



* Estabilidad Fab °C

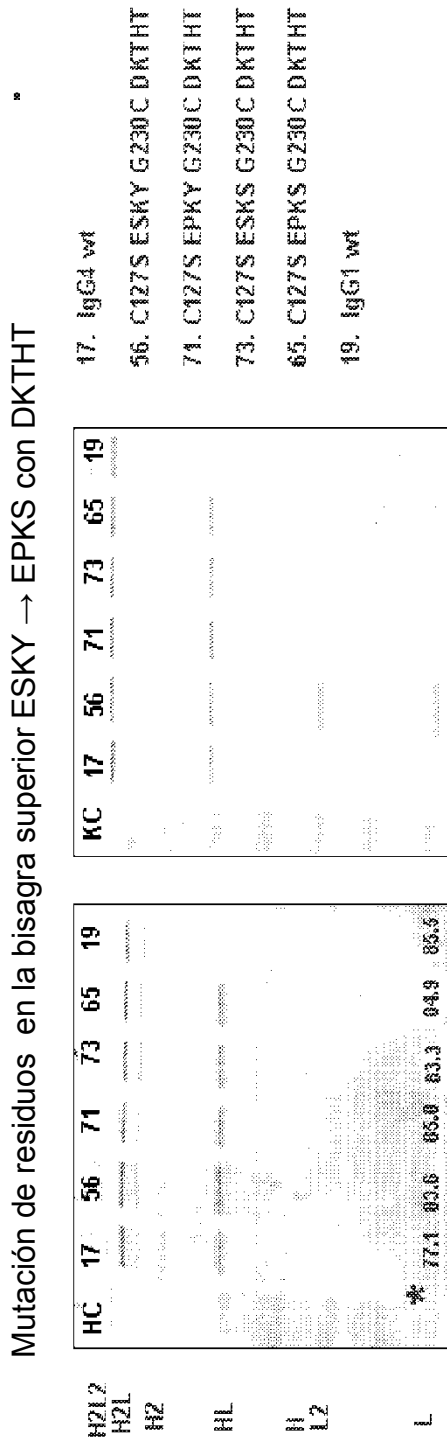
Figura 23

Mutación de residuos en la bisagra superior ESKY → EPKS con PP



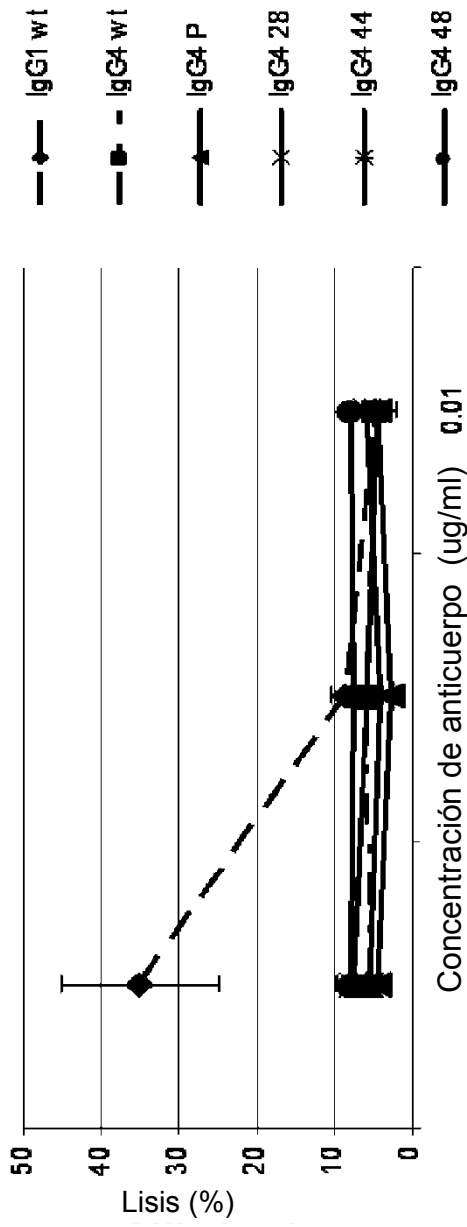
* Estabilidad Fab °C

Figura 24



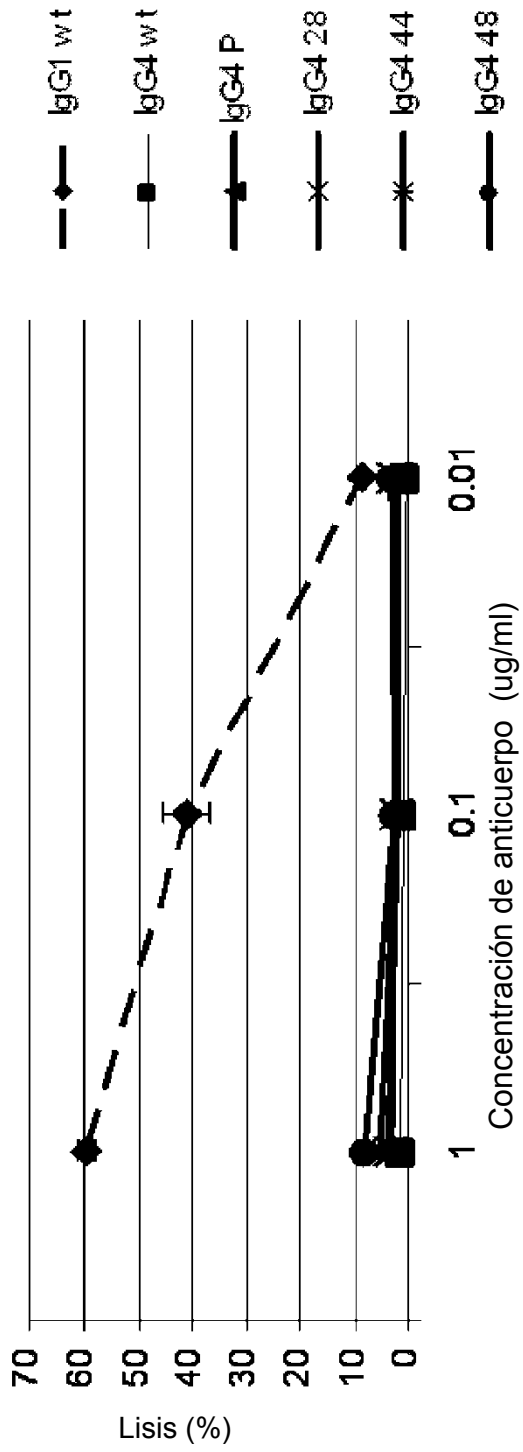
* Estabilidad Fab °C

Figura 25 MCF7



No incremento en porcentaje de lisis observado para mutantes IgG4 comparado con IgG4 wt en la línea celular MCF7

Figura 26 Skbr3



No incremento en porcentaje de lisis observado para mutantes IgG4 comparado con IgG4 wt en la línea celular Skbr3

Figura 27 Expresión relativa a IgG4 tipo salvaje

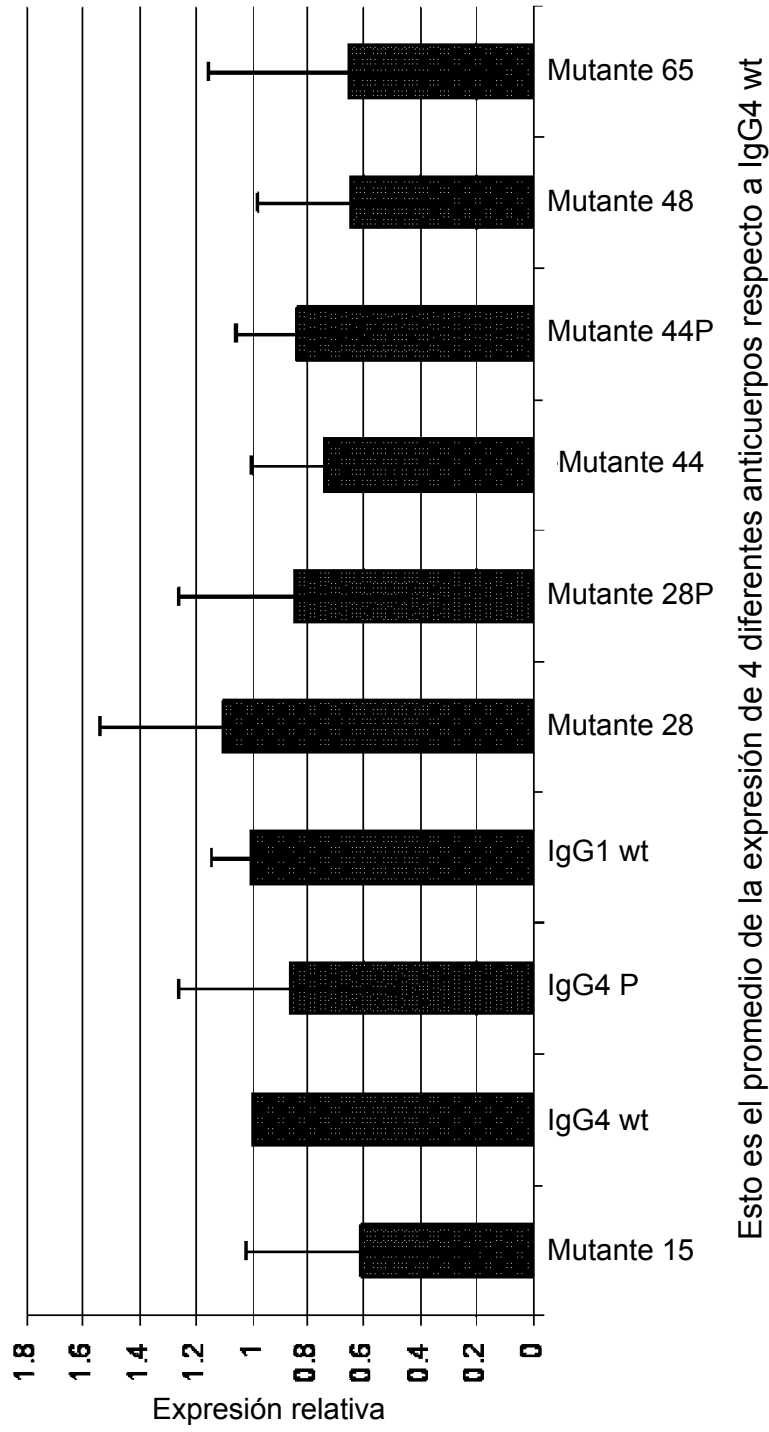
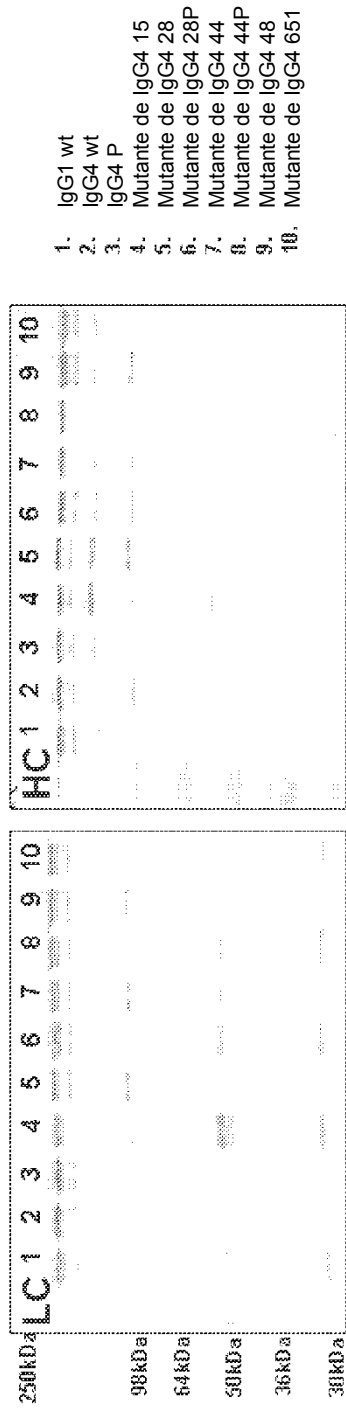


Figura 28 Expresión



1. IgG1 wt
2. IgG4 wt
3. IgG4 P
4. Mutante de IgG4 15
5. Mutante de IgG4 28
6. Mutante de IgG4 28P
7. Mutante de IgG4 44
8. Mutante de IgG4 44P
9. Mutante de IgG4 48
10. Mutante de IgG4 651

Figura 29 Expresión

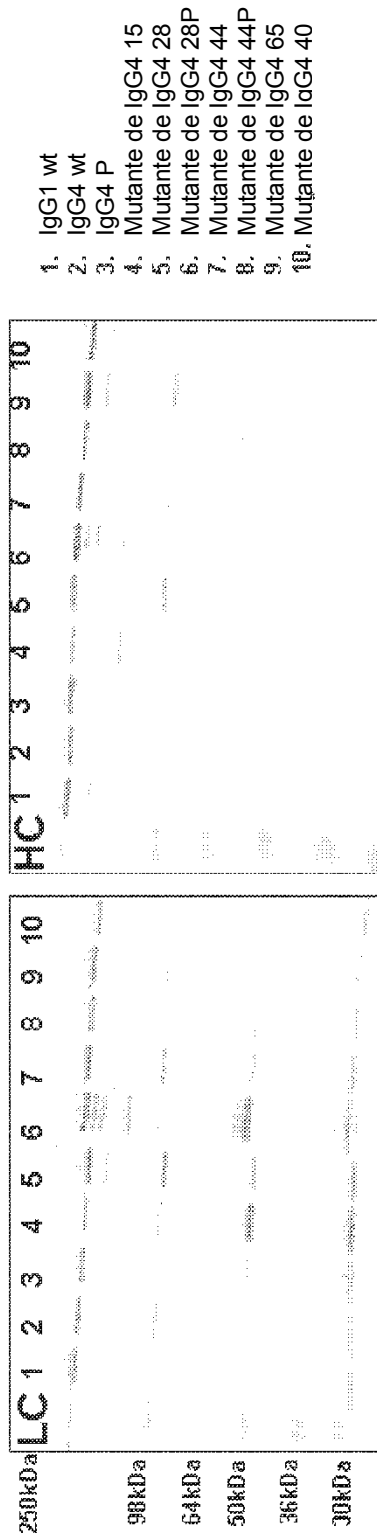


Figura 30 Expresión

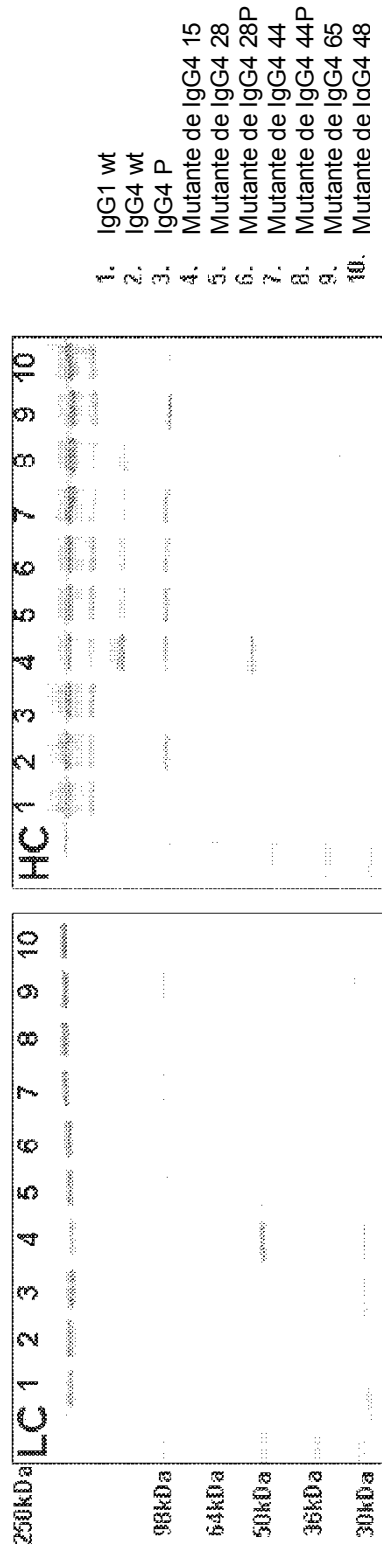
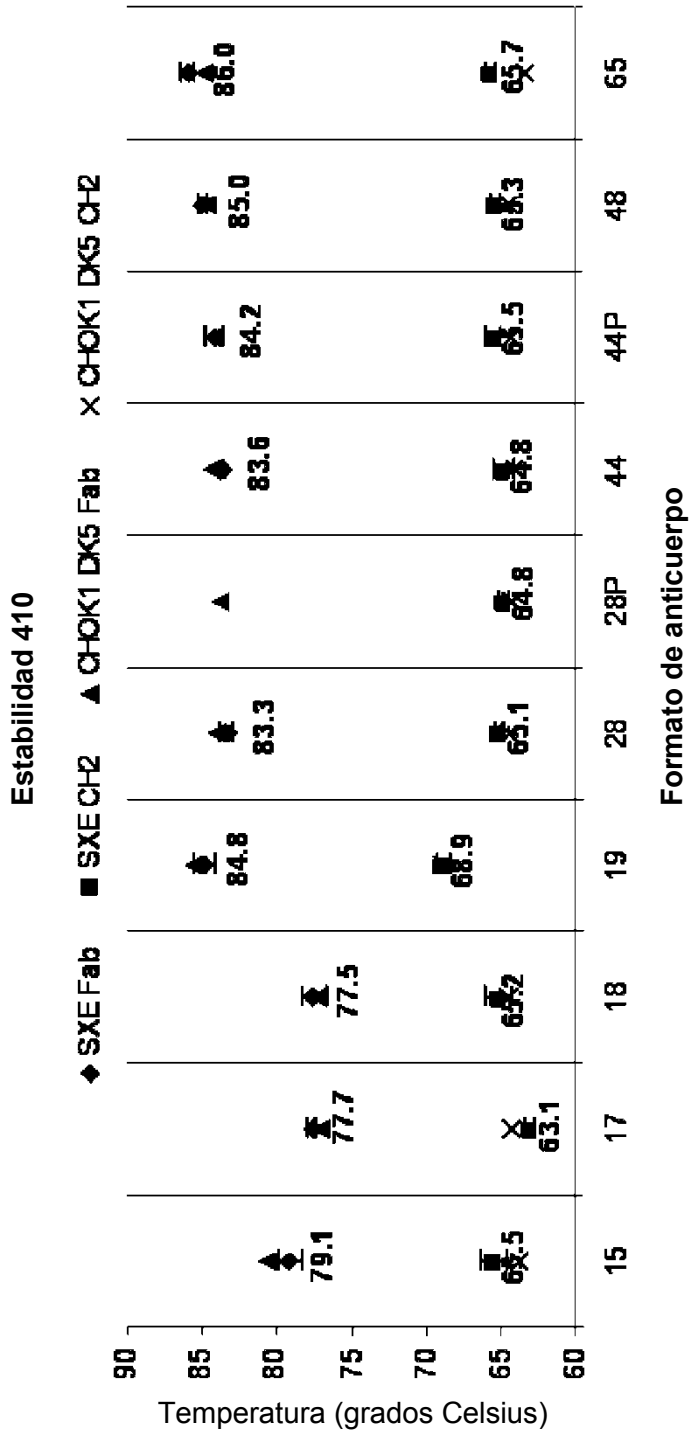


Figura 31



La comparación entre el material expresado de CHOSXE y CHOK1 DK5 no muestra diferencia

Figura 32

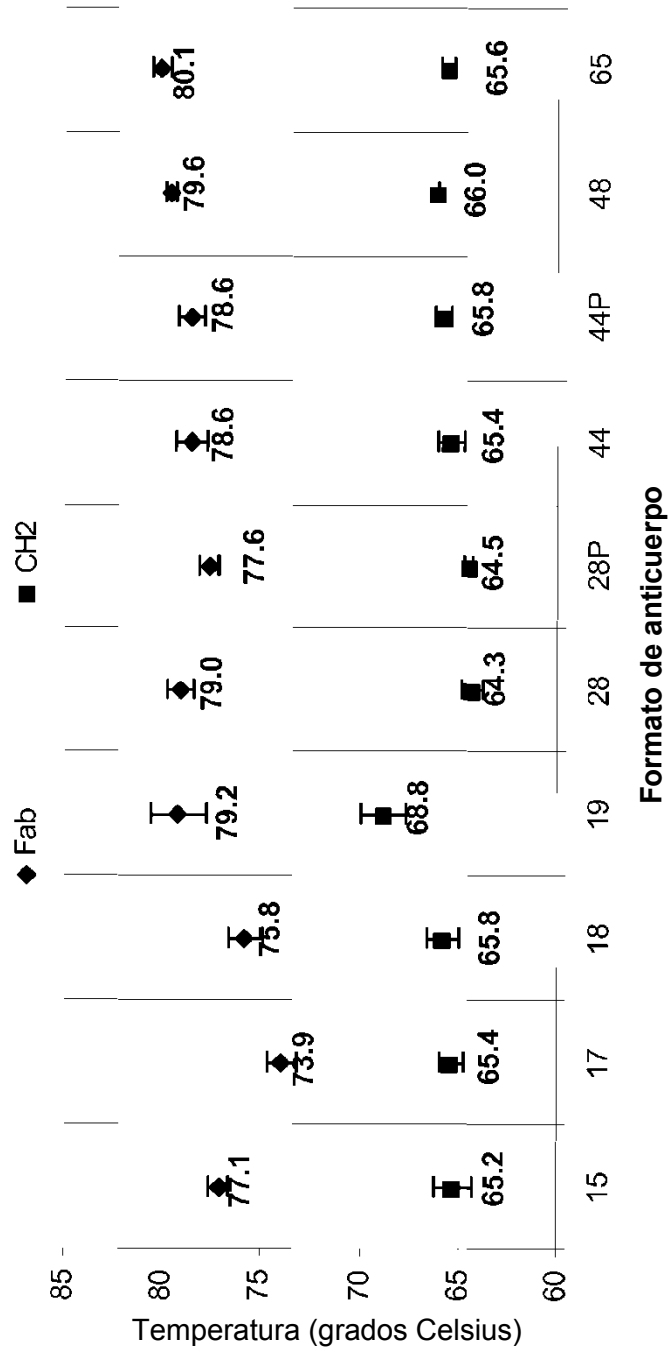


Figura 33

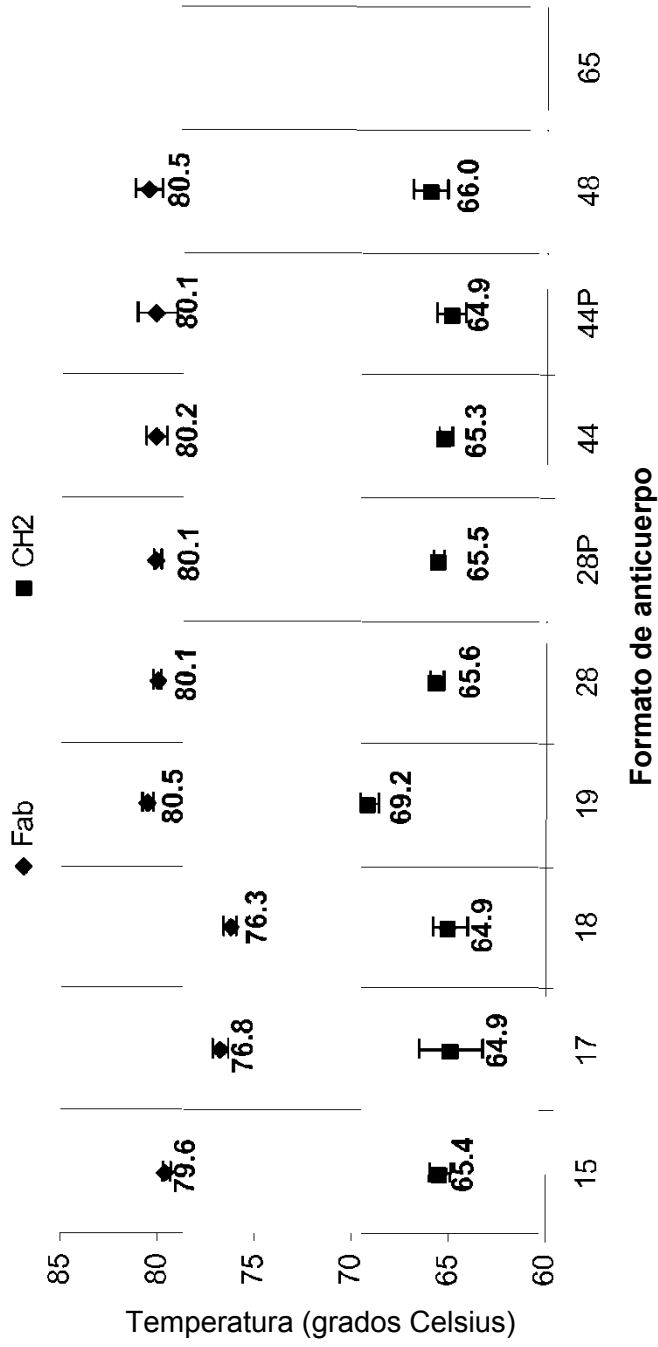


Figura 34

