

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 708**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2012 PCT/EP2012/062273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2012 E 12735242 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2723770**

54 Título: **Variantes Fc con funciones efectoras reducidas**

30 Prioridad:

24.06.2011 EP 11305811

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

23.04.2020

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3, Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**FONTAYNE, ALEXANDRE;
JORIEUX, SYLVIE;
MONNET-MARS, CÉLINE;
MONDON, PHILIPPE;
KHARRAT, ABDELHAKIM y
BOUAYADI, KHALIL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 755 708 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

Variantes Fc con funciones efectoras reducidas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para preparar variantes Fc que presentan actividades efectoras reducidas.

Descripción de la técnica relacionada

10 Las sustancias terapéuticas derivadas de anticuerpos se usan cada vez más en el tratamiento de una variedad de estados patológicos tales como cánceres, trastornos autoinmunes, rechazos de injertos y enfermedades infecciosas. En 2010, se aprobaron para uso clínico más de treinta y siete anticuerpos y proteínas derivadas, y más de 1137 estuvieron en desarrollo clínico, de los cuales el 71% fueron IgG completas. La mayoría de ellos (91%) contienen una región Fc de IgG, y corresponden a anticuerpos monoclonales (mAbs) de longitud completa o a proteínas de fusión, también denominadas immunoadhesinas (Thompson Pharma August 2010).

15 Diversos estudios han mostrado que las funciones efectoras de los anticuerpos son cruciales para la eficiencia de la inmunoterapia, en particular para el tratamiento de cánceres, en el que se busca la destrucción de la diana celular. Las funciones efectoras que permiten erradicar la diana celular engloban mayoritariamente la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La CDC es accionada principalmente a través de la unión directa del dominio Fc con el primer componente del complemento C1q, mientras que ADCP y ADCC son accionadas mediante la unión del dominio Fc con receptores Fc gamma (FcγRs). El dominio Fc de los anticuerpos también está implicado en la persistencia sérica a través de la interacción con el receptor Fc neonatal (FcRn). A lo largo de la última década, se han concentrado de este modo tremendos estudios para potenciar la capacidad de los anticuerpos para inducir respuestas ADCC y CDC y para incrementar su semivida sérica al mejorar la afinidad por FcRn.

25 Sin embargo, en el tratamiento de algunas afecciones específicas, la inducción de ADCC, CDC y/o ADCP no es necesaria para lograr el efecto terapéutico. En algunos casos, tales inducciones se han de evitar a fin de reducir los efectos secundarios y evitar la citotoxicidad de IgG, tal como en el caso del tratamiento de rechazo continuado del injerto con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 ortoclone OKT3. Se mostró que la administración de ortoclone OKT3 induce liberación sistémica masiva de citocinas proinflamatorias, que es una consecuencia de la unión de ortoclone OKT3 a receptores Fc gamma. También se ha mostrado que la activación de los FcγRs puede tener un impacto adverso sobre el tratamiento, tal como para el anticuerpo dirigido contra EGFR, cetuximab, que se ha sugerido que activa macrófagos M2 promotores de tumores y disminuye la supervivencia de los pacientes libre de progresión (Pander J. et al., 2011).

35 Desde un punto de vista general, cuando el anticuerpo o la immunoadhesina se usa solamente como un agente bloqueante o neutralizante dirigido contra una diana endógena o infecciosa, o como un agonista o antagonista de un receptor celular, el reclutamiento del sistema inmune a través de la unión de la región Fc de dicho anticuerpo o immunoadhesina a FcγR y C1q no es crucial para la eficiencia terapéutica de la inmunoterapia, e incluso de este modo se debería evitar.

40 A este respecto, se mostró que las cuatro subclases de IgG humanas exhiben distintas funciones efectoras. Por un lado, IgG1 e IgG3 accionan las actividades tanto de ADCC como de CDC. Por otro lado, IgG2 provoca la actividad de CDC pero no de ADCC, e IgG4 presenta una capacidad muy pobre para inducir activación celular y del complemento, debido a la baja afinidad por C1q y receptores Fc gamma. En consecuencia, IgG4 se ha convertido en la subclase preferida para la inmunoterapia, en la el reclutamiento de la función efectora del hospedante es indeseable. Ya se han aprobado anticuerpos IgG4 neutralizantes para el tratamiento de afecciones específicas. Por ejemplo, natalizumab es un mAb anti-integrina α4 para el tratamiento de esclerosis múltiple. A pesar de este hecho, sigue existiendo cierta resistencia con respecto al uso de IgG4 en inmunoterapia, debido a su inestabilidad y dinámica *in vivo*.

50 Como alternativa, se concibió una variante Fc de IgG4 que comprende la modificación de aminoácido S228P. Se mostró que dicha modificación estabiliza la formación del dímero de cadena pesada con intercambio del brazo de Fab todavía posible en bajas proporciones (<8,3%) (Labrijn et al., Nature Biotech, 2009, 27, 767-771). También se modificaron híbridos de IgG a fin de generar nuevos mAbs terapéuticos con bajas actividades efectoras y un perfil farmacológico mejorado (Reddy et al., The Journal of Immunology, 2000, 164, 1925-1933). Alexion Pharmaceuticals ha desarrollado un anticuerpo IgG2/4 kappa humanizado contra el componente del complemento C5, denominado eculizumab. Las cadenas pesadas de eculizumab comprenden secuencias de IgG2 humanas en la región constante 1 (CH1), la bisagra y la porción adyacente de la región constante 2 (CH2), y secuencias de IgG4 humanas en la parte restante de CH2 y en la región constante 3 (CH3). Eculizumab se ha aprobado para el tratamiento de hemoglobinuria paroxística nocturna y síndrome urémico hemolítico por la Agencia Europea de Medicamentos.

En base a las diferencias estructurales entre IgG2 e IgG4, An et al. concibieron una variante de IgG2 con funciones efectoras alteradas introduciendo cuatro aminoácidos de IgG4 (a saber, 268Q/309L/330S/331S) en las posiciones correspondientes en la cadena pesada de IgG2. La IgG resultante no mostró unión detectable a C1q, FcγRI y FcγRIIIa, y mostró una mala afinidad por FcγRIIb/c, mientras todavía tiene una semivida sérica similar a la de IgG2 de tipo salvaje (An et al., mAbs, 2009,1:6,572-579).

Además, diversos estudios de mutagénesis específica del sitio y de mutagénesis al azar en la región Fc de IgG1 han conducido a la identificación de aminoácidos críticos implicados en la unión de IgG1 a C1q y a diversos receptores promotores de ADCC (para un repaso, véase Strohl, Current opinion in Biotechnol, 2009, 20, 685-691). Se mostró que los aminoácidos en el dominio de bisagra inferior y, en particular, los restos de leucina en las posiciones 234 y 235 son críticos para la afinidad de la región Fc de IgG1 por tanto C1q, FcγRI, FcγRII como FcγRIII. También se encontraron posiciones determinantes en el dominio CH2, tales como las posiciones de aminoácidos 327, 330 y 331, cuyas mutaciones pueden reducir enormemente la capacidad de inducir respuestas tanto de ADCC como de CDC.

En consecuencia, Xu et al. mostraron que la introducción de las mutaciones 234A/235A en un anticuerpo OKT3 a base de IgG1 humana reduce significativamente la unión a FcγRI, FcγRII y C1q, que evita el síndrome de liberación de citocinas observado con el anticuerpo OKT3 sin modificar, a la vez que mantiene la capacidad de rechazo continuado inverso del injerto (Xu et al., Cell Immunol, 2000, 1:16-26).

Hezareh et al. realizaron la misma observación con respecto a la afinidad por moléculas efectoras para una variante de IgG1 anti-VIH-1 que comprende las mutaciones 234A/235A (Hezareh et al., Journal of virology, 2001, 12161-12168).

De la misma manera, Oganessian et al. describieron que la introducción de la mutación triple 234F/235E/331S en un IgG1 anti-CD19 dio como resultado una pérdida completa de la unión a varias moléculas efectoras, a saber, FcγRI, FcγRIIIa y FcγRIII y C1q (Oganessian et al. Acta cryst., 2008, D64, 700-704).

De forma similar, InvivoGen comercializó un plásmido que codifica una variante Fc de IgG1 manipulada humana, que comprende las mutaciones 233P/234V/235A/236Del/327G/330S/331S. Tales mutaciones reducen drásticamente la capacidad de la variante Fc de IgG1 para inducir ADCC y CDC.

El documento WO2010/106180 describe variantes Fc que tienen una mayor afinidad de unión por FcRn.

Todas estas invenciones descritas anteriormente implican la sustitución de aminoácidos humanos por restos que son inesperados en estas posiciones y podrían provocar potencialmente una respuesta inmune cuando se usan en mAbs que se administran a pacientes.

También se mostró que la glicosilación en asparagina en la posición 297 de la región Fc tiene un impacto directo sobre la capacidad de los anticuerpos monoclonales para unirse a FcγR y para accionar ADCC (para un repaso, véase Abès et al., Pharmaceuticals, 2010, 3, 146-157).

Aunque en la técnica anterior se describieron variantes Fc que exhiben actividades bajas de ADCC y CDC, todavía existe la necesidad de un método para preparar nuevas variantes Fc que exhiban actividad reducida por C1q y receptores Fc gamma.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para producir una variante de un polipéptido progenitor, que comprende una región Fc de SEQ ID NO:1, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 294Del, en la que dicha modificación de aminoácido 294del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor, 293Del y 293Del/294Del, se introduce en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración de la región Fc a la numeración según el índice EU (como en Kabat), o su equivalente en Kabat (numeración de Kabat).

Otro objeto de la invención es una variante de un polipéptido progenitor, que comprende una región Fc de SEQ ID NO:1, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR escogido de FcγRII y FcγRIII en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y comprende una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 293Del/294Del en su región Fc, refiriéndose la numeración de los aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU, o equivalente en Kabat.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la mencionada variante, y al uso de la mencionada variante como se define en la reivindicación 12 para prevenir o tratar un estado patológico en el que no es deseable la inducción de una respuesta ADCC y/o CDC.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra alineamientos de secuencias de IgG1 humana nativa, que se refieren a las posiciones 216-447 (según el índice EU), con las secuencias correspondientes de IgG2 humana (SEQ ID NO:7), IgG3 humana (SEQ ID NO:8) e IgG4 humana (SEQ ID NO:9). Las secuencias de IgG1 se refieren al alotipo G1m1,17 (SEQ ID NO:5) y al alotipo G1m3 (SEQ ID NO:6). El dominio "bisagra inferior-CH2-CH3" de IgG1 comienza en la posición 226 (véase la flecha).

La Figura 2 muestra el vector plasmídico pMGM05-R603 en el que el gen de Fc humano que codifica los restos de aminoácidos 226-447 (según el índice EU) derivados de una cadena pesada de IgG1 humana (Fc226, SEQ nº1) se clonó entre los dos sitios de restricción *BamHI* y *NotI*.

10 Descripción detallada de la invención

a. Definiciones

A fin de que la solicitud se pueda entender de forma más completa, se exponen a continuación varias definiciones. Tales definiciones pretenden englobar equivalentes gramaticales.

15 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la numeración de los restos en la región Fc es la de la cadena pesada de inmunoglobulina según el índice EU como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). El "índice EU" o "índice EU como en Kabat" se refieren aquí a la numeración de restos del anticuerpo IgG1 EU humano. El equivalente en Kabat se refiere al número en la numeración de Kabat.

20 Por "polipéptido" o "proteína", como se usan aquí, se quiere decir al menos dos aminoácidos enlazados covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

Por "aminoácido", como se usa aquí, se quiere decir uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualesquiera análogos no naturales que puedan estar presentes en una posición definida específica.

25 Por "modificación de aminoácido" se quiere decir aquí un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. "Modificaciones de aminoácidos", que también se puede denominar "cambios de aminoácidos", incluye aquí mutaciones de aminoácidos tales como sustitución, inserción, y/o supresión en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" se quiere decir aquí la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución N434S se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante Fc, en el que la asparagina en la posición 434 se sustituye por serina. Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa aquí, se quiere decir la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. Por ejemplo, el inserto G>235-236 designa una inserción de glicina entre las posiciones 235 y 236. Por "supresión de aminoácido" o "supresión", como se usa aquí, se quiere decir la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica progenitora. E294Del o 294Del designa que se suprime el aminoácido 294 (aquí, un glutamato). Una modificación de aminoácido se puede referir a una mutación puntual o a una combinación de mutaciones.

35 En el caso de una combinación de mutaciones de aminoácidos, el formato preferido es el siguiente: 294Del/259I/315D/434Y o E294Del/V259I/N315D/N434Y. Esto significa que hay cuatro mutaciones de aminoácidos en la región Fc de la variante, en comparación con su polipéptido progenitor: una en la posición 294, una en la posición 259, una en la posición 315 y una en la posición 434, y que el aminoácido en la posición 294, es decir, glutamato, está suprimido, el aminoácido en la posición 259 del polipéptido progenitor, es decir, valina, se sustituye por isoleucina, que el aminoácido en la posición 315 del polipéptido progenitor, es decir, asparagina, se sustituye por ácido aspártico, y que el aminoácido en la posición 434 del polipéptido progenitor, es decir, asparagina, se sustituye por tirosina. De la misma manera, la modificación de aminoácidos 293Del/294Del significa que los aminoácidos en la posición 293 y 294 están suprimidos, en comparación con el progenitor polipeptídico.

45 El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio. "Anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que comprende al menos (i) una región Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión derivado de una región variable de una inmunoglobulina. De este modo, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas de longitud completa, anticuerpos multiespecíficos, proteína de fusión con Fc que comprende al menos una región variable, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados aquí como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos manipulados que comprenden más de una región Fc, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, proteínas de fusión con anticuerpos, conjugados de anticuerpos y fragmentos de cada uno respectivamente.

55 Por "anticuerpo de longitud completa" o por "inmunoglobulina", como se usan aquí, se quiere decir la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. El "anticuerpo de longitud completa" cubre anticuerpos de longitud completa monoclonales, anticuerpos de longitud completa de tipo salvaje, anticuerpos de longitud completa quiméricos, anticuerpos de longitud completa humanizados, anticuerpos de longitud completa totalmente humanos, siendo la lista no limitativa.

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

La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento antigénico, y que comprende las denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de las funciones efectoras.

En el caso de inmunoglobulinas humanas, las cadenas ligeras se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente.

Por "IgG", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están codificados sustancialmente por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En seres humanos, IgG comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En ratones, IgG comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Las IgG de longitud completa consisten en dos pares idénticos de dos cadenas inmunoglobulínicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo cada cadena ligera los dominios inmunoglobulínicos VL y CL, y comprendiendo cada cadena pesada los dominios inmunoglobulínicos VH, C γ 1 (también denominado CH1), C γ 2 (también denominado CH2), y C γ 3 (también denominado CH3). En el contexto de IgG1 humana, "CH1" se refiere a las posiciones 118-215, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 231-340, y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU, o, respectivamente, 114-223, 244-360 y 361-478 en la numeración de Kabat. IgG1 también comprende un dominio bisagra, que se refiere a las posiciones 216-230 en el caso de IgG1 según el índice EU, o 226-243 en Kabat.

Por "Fc" o "región Fc", como se usa aquí, se quiere decir la región constante de una inmunoglobulina de longitud completa, excluyendo el primer dominio inmunoglobulínico de la región constante. De este modo, Fc se refiere a los dos últimos dominios inmunoglobulínicos de región constante de IgA, IgD, e IgG, a los tres últimos dominios inmunoglobulínicos de región constante de IgE e IgM, y a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende dominios inmunoglobulínicos CH2, CH3 y la región de bisagra inferior entre CH1 y CH2. En otras palabras, la región Fc de IgG1 consiste en el dominio "bisagra inferior-CH2-CH3", es decir, el dominio desde el aminoácido C226 hasta el extremo carboxi terminal, en el que la numeración es según el índice EU o equivalente en Kabat. Los dominios análogos para otras subclases de IgG se pueden determinar a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas o fragmentos de cadenas pesadas de dichas subclases de IgG con la de IgG1 humana.

Por "polipéptido Fc", como se usa aquí, se quiere decir un polipéptido que comprende toda o una parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fusiones de Fc, Fcs aislados, conjugados de Fc y fragmentos de Fc.

Por "polipéptido progenitor" o "progenitor polipeptídico", como se usan aquí, se quiere decir un polipéptido sin modificar que se modifica subsiguientemente para generar una variante. Dicho polipéptido puede comprender una única cadena polipeptídica, o varias cadenas polipeptídicas que no están enlazadas covalentemente juntas. Dicho polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (polipéptido de tipo salvaje), una variante o una versión modificada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural, o un polipéptido sintético. Una versión modificada mediante ingeniería o una versión variante de un polipéptido de origen natural es un polipéptido que no está codificado por un gen de origen natural. Por ejemplo, el polipéptido modificado mediante ingeniería puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Polipéptido progenitor se puede referir al propio polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En el contexto de la presente invención, el polipéptido progenitor comprende una región Fc seleccionada del grupo de regiones Fc de tipo salvaje, sus fragmentos y sus mutantes. En consecuencia, el polipéptido progenitor puede comprender opcionalmente modificaciones de aminoácidos preexistentes en su región Fc (es decir, un mutante Fc), en comparación con las regiones Fc de tipo salvaje. Ventajosamente, el polipéptido progenitor es un anticuerpo, una inmunoglobulina, un polipéptido de fusión con Fc, un conjugado con Fc, no siendo esta lista limitativa.

Por "polipéptido variante", "variante polipeptídica" o "variante", como se usan aquí, se quiere decir una secuencia polipeptídica que difiere de aquella de una secuencia polipeptídica progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido en la región Fc.

Por "tipo salvaje o WT" se quiere decir aquí una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que se encuentra en la naturaleza, es decir, que es de origen natural, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. WT, tienen una secuencia de aminoácidos o una secuencia

nucleotídica que no se ha modificado intencionadamente mediante técnicas de biología molecular tal como mutagénesis. Por ejemplo, “regiones Fc de tipo salvaje” incluye, sin limitarse a, región Fc de IgG1 que tiene la secuencia SEQ ID N°1, región Fc de IgG2 que tiene la secuencia SEQ ID N°2, región Fc de IgG3 que tiene la secuencia SEQ ID N°3, y región Fc de IgG4 que tiene la secuencia SEQ ID N°4.

- 5 Las expresiones “receptor Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a una región Fc (por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo).

Las expresiones “receptores Fc gamma”, “receptores Fc γ ” o “Fc γ Rs” se refieren a receptores humanos que se unen a la región Fc de anticuerpos IgG. Como se usan aquí, los Fc γ Rs incluyen las subclases Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), incluyendo sus variantes alélicas y, como alternativa, formas ajustadas de estos receptores.

- 10 Estos Fc γ Rs también se definen como receptores activadores (Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, Fc γ RIIIa/b) o receptor inhibidor (Fc γ RIIb), puesto que provocan o inhiben funciones inmunes.

La familia Fc γ RI está compuesta de tres genes (FCGR1A, FCGR1B y FCGR1C), pero solamente el producto de FCGR1A se ha identificado como receptor de superficie de longitud completa. El mencionado producto, a saber Fc γ RI, es expresado por células dendríticas (DC), macrófagos, y también por neutrófilos activados.

- 15 La familia Fc γ RII está compuesta de tres genes (FCGR2A, FCGR2B y FCGR2C) que codifican las proteínas Fc γ RIIa, Fc γ RIIb y Fc γ RIIc. Fc γ RIIa se expresa en monocitos, en ciertas células dendríticas y neutrófilos. Fc γ RIIc es expresado en células asesinas naturales (NK). Fc γ RIIb es el Fc γ R ampliamente expresado. Fc γ RIIb está presente virtualmente en todos los leucocitos, con la excepción de células NK y células T.

- 20 Fc γ RIII están compuestos de dos genes FCGR3A y FCGR3B, que codifican Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. La proteína Fc γ RIIIa es expresada como una proteína transmembránica en monocitos, macrófagos específicos de tejidos, en células dendríticas, células T δ/γ , y en células asesinas naturales. Fc γ RIIIb es un receptor anclado a GPI expresado sobre la superficie de neutrófilos y basófilos.

- 25 Dos alelos del gen que codifica Fc γ RIIIa generan 2 variantes que difieren en la posición 131 (Fc γ RIIIaR131 poco respondedor y Fc γ RIIIaH131 muy respondedor). De forma similar, dos alelos del gen que codifica Fc γ RIIIa generan 2 variantes que difieren en la posición 158 (Fc γ RIIIaF158 poco respondedor y Fc γ RIIIaV158 muy respondedor).

Claramente, las células NK, que se cree que son los mediadores cruciales de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, expresan solamente Fc γ RIIIa y Fc γ RIIc, y ninguno de los otros Fc γ Rs, en particular, el Fc γ RIIb inhibidor.

Cada proteína Fc γ R tiene preferencias de unión a ligando diferenciales con respecto a las subclases de IgG, y afinidades distintas por las subclases de IgG.

- 30 Los Fc γ Rs activantes disparan diversas respuestas inmunes tales como fagocitosis, estallido respiratorio y producción de citocinas (TNF- α , IL-6) mediante células presentadoras de antígeno (APC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y desgranulación por neutrófilos y células NK. Los Fc γ Rs activantes también presentan un papel importante en el aclaramiento del complejo inmune. Por otro lado, el receptor inhibidor Fc γ RIIb es un elemento regulador crítico en la homeostasis de células B. Controla el umbral y el grado de activación celular.

- 35 Como se usa aquí, “toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o ADCC se refiere a un mecanismo de inmunidad mediada por células mediante el cual una célula efectora del sistema inmune lisa de forma activa una célula diana que ha sido unida por anticuerpos específicos. ADCC está mediada mayoritariamente por células NK, pero también por otras células inmunes tales como neutrófilos y eosinófilos. Típicamente, ADCC resulta de la activación de células NK. La activación de células NK implica la unión de sus receptores Fc a la región Fc de IgG unida a antígenos presentes en la superficie de células diana. Tales interacciones inducen la liberación por células NK de citocinas y gránulos citotóxicos. Para evaluar la capacidad de un anticuerpo para inducir ADCC, se puede llevar a cabo un ensayo como se describe en de Romeuf et al. Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6):635-43.

- 45 Como se usa aquí, C1q es una molécula hexavalente con un peso molecular de aproximadamente 460.000 kDa y una estructura enlazada a un ramillete de tulipanes en el que seis “tallos” colagenosos están conectados a seis regiones de cabeza globular. C1q forma con las dos serina proteasas, C1r y C1s, el complejo C1, que es el primer componente de la ruta de la cascada del complemento.

- 50 “Citotoxicidad dependiente del complemento” o CDC se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de un complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia mediante la unión de C1q a anticuerpos que están unidos a su antígeno relacionado. Para activar la cascada del complemento, C1q se ha de unir a al menos dos moléculas de IgG1, IgG2, o IgG3, pero solamente a una molécula de IgM. Para evaluar la capacidad de un anticuerpo para inducir CDC, se puede llevar a cabo un ensayo como se describe en Romeuf et al., Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6):635-43.

Los receptores Fc gamma y sus funciones se repasan en Nimmerjahn y Ravetch, Nature reviews Immunology, 2008, 8, 34-47.

C1q y su función se repasan, por ejemplo, en Kishore et al., Immunopharmacology, 2000, 49:159-170 y Sjöberg et al. Trends Immunol. 2009 30(2):83-90.

- 5 Por "FcRn" o "receptor Fc neonatal", como se usan aquí, se quiere decir una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y es codificada al menos en parte por un gen FCRN. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, denominados a menudo como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina, y la cadena pesada está codificada por el gen FCRN. FcRn o proteína FcRn se refiere al complejo de cadena α con beta-2-microglobulina. En el ser humano, el gen que codifica FcRn se denomina FCGRT. FcRn está implicado en la transferencia de inmunidad humoral pasiva desde una madre a su feto, y también en el control del aclaramiento de las IgGs.

FcRn y su función se repasan, por ejemplo, en Roopenian, Nature Reviews Immunology, 2007, 7, 715-725.

b. Método para disminuir la unión de Fc a C1q y Fc γ Rs

- 15 La presente invención se refiere a un método para preparar variantes Fc que presentan afinidad reducida por C1q y por al menos un receptor Fc γ , en comparación con su polipéptido progenitor.

20 El solicitante mostró que la introducción de una única mutación de aminoácido en la región Fc de IgGs tanto de tipo salvaje como modificadas mediante ingeniería permite reducir significativamente la unión de dichas IgGs tanto a la proteína C1q como a los receptores Fc γ . La mencionada única mutación corresponde a la supresión del aminoácido en la posición 294 (denominada aquí más abajo 294Del), refiriéndose la numeración del aminoácido a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.

25 De forma más precisa, el solicitante mostró mediante ensayo ELISA (véanse III.2.1 y III.2.2 en el ejemplo) que la variante de IgG1 obtenida introduciendo 294Del en la secuencia de aminoácidos de una IgG1 que comprende la región Fc de tipo salvaje (es decir, una región Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1) no se pudo unir, o presentó una unión reducida en comparación con variantes de IgG1 de tipo salvaje correspondientes, a la proteína C1q, Fc γ RIIb (también denominado CD32b), Fc γ RIIIa (también denominado CD32a), Fc γ RIIIa (también denominado CD16a) y Fc γ RI (también denominado CD64). Ciertamente, la introducción de la mutación 294Del también permitió abolir o limitar la afinidad de unión a C1q y receptores Fc γ en polipéptidos IgG1 manipulados inicialmente mediante ingeniería para que muestren una mayor afinidad por FcRn en comparación con IgG1 de tipo salvaje.

- 30 Por ejemplo, la variante de IgG1 que tiene las mutaciones 294Del/256N/378V/383N/434Y en comparación con IgG1 de tipo salvaje fue incapaz de unirse tanto a C1q como los receptores Fc γ R.

Por el contrario, su progenitor IgG1, que posee de este modo las mutaciones 256N/378V/383N/434Y, tuvo una mayor capacidad para unirse a C1q y Fc γ RIIIa, en comparación con IgG1 de tipo salvaje.

- 35 Se obtuvieron resultados similares para la variante 294Del/259I/315D/434Y en comparación con su polipéptido progenitor, que comprende la modificación de aminoácido 259I/315D/434Y. El mencionado polipéptido progenitor tiene capacidad similar para unirse a C1q y a Fc γ RIIIa, en comparación con IgG1 de tipo salvaje.

40 De forma similar, las variantes 294Del, 293Del, 293Del/294Del, 294Del/256N/378V/383N/434Y, 294Del/259I/315D/434Y, 294Del/397M, 294Del/302A, 294Del/434S, 294Del/315D, 294Del/230S, 294Del/307A, 294Del/228R, 230S/315D/428L/434Y, 294Del/378V y 294Del/434Y presentan una menor unión a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fc γ , en comparación con su polipéptido progenitor respectivo. Al contrario, los mencionados polipéptidos progenitores tuvieron mayor capacidad para unirse a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fc γ en comparación con IgG1 de tipo salvaje. El solicitante mostró además que la variante de IgG1 obtenida introduciendo 294Del en la secuencia de aminoácidos de una IgG1 que comprende la región Fc de tipo salvaje presenta una unión similar a FcRn en comparación con su IgG1 progenitora respectiva. Por unión similar, se pretende que la introducción de la modificación de aminoácido 294Del, la mencionada mutación, solo dé como resultado una alteración menor que 35% de la unión a FcRn para las variantes, en comparación con su IgG1 progenitora. Por menor que 35%, se quiere decir menor que 30%, menor que 25%, menor que 20%, menor que 15%, menor que 10%, y menor que 5%.

- 50 Se espera que, mediante la disminución de la capacidad para unirse a C1q y a Fc γ Rs, la introducción de la mutación 294Del impacte la actividad de CDC y de ADCC de la variante de IgG1, respectivamente, en comparación con la IgG1 progenitora.

El aminoácido en la posición 293 es también un ácido glutámico. Su supresión conduce a la misma secuencia nucleotídica y de aminoácidos que la supresión del ácido glutámico en la posición 294. Por lo tanto, las variantes 293Del y 294Del son los mismos polipéptidos. En consecuencia, un primer objeto de la presente invención es

5 proporcionar un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fc γ en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido, seleccionada del grupo que consiste en 294Del o 293Del y 293Del/294Del, en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración del aminoácido en la región Fc a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.

La variante exhibe unión reducida a C1q y a al menos un receptor Fc γ , en comparación con el mencionado polipéptido progenitor.

10 Como se explica en la parte anterior titulada "definiciones", un polipéptido progenitor se refiere a un polipéptido que comprende una región Fc. Dicho polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (polipéptido de tipo salvaje), una variante o una versión modificada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural, o un polipéptido sintético. Los polipéptidos progenitores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, proteínas de fusión con Fc, conjugados con Fc, polipéptidos derivados de Fc, Fc aislado, y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el polipéptido modificado mediante ingeniería puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

15 La región Fc del polipéptido progenitor se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de subclases de IgG humanas, fragmentos y mutantes de las mismas. Aquí, región Fc de IgGs humanas corresponde al dominio "bisagra inferior"-CH2-CH3. El dominio "bisagra inferior"-CH2-CH3 de las IgG1s humanas de tipo salvaje se refiere a aminoácidos desde la posición 226 hasta la posición 447 según el índice EU o equivalente en Kabat. Los dominios análogos para otras subclases de IgG humanas se pueden determinar a partir del
20 alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de dichas subclases de IgG con la de IgG1s humanas, como se muestra en la Figura 1.

Las subclases de IgG humanas comprenden IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, incluyendo sus diversos alotipos. Las secuencias de regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se correlacionan con las secuencias de SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 y SEQ ID N°4 respectivamente.

25 Fragmentos de región Fc se definen como polipéptidos que comprenden uno o más polipéptidos derivados de una región Fc de tipo salvaje. El mencionado fragmento de la región Fc comprende preferiblemente al menos 100 restos consecutivos de la región Fc de tipo salvaje. Al menos 100 restos consecutivos de una región Fc de tipo salvaje engloba al menos 140, al menos 160, al menos 200, al menos 210 restos consecutivos de dicha región Fc de tipo salvaje.

30 Como se menciona anteriormente, el polipéptido progenitor puede comprender un mutante Fc de tipo salvaje, es decir, una región Fc que ya comprende mutaciones de aminoácidos preexistentes, tales como adiciones, inserciones y/o sustituciones, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje.

35 Como se menciona previamente, "polipéptido variante" o "variante", como se usa aquí, quiere decir una secuencia polipeptídica que difiere de la de un polipéptido progenitor en virtud de al menos una modificación de aminoácido. En el presente caso, la al menos una modificación de aminoácido engloba necesariamente una modificación de aminoácido seleccionada de la mutación 294Del, la mutación 293Del, y la combinación de la mutación 293Del/294Del.

40 El polipéptido variante según la presente invención exhibe una unión reducida al primer componente del complemento C1q en comparación con su polipéptido progenitor. En otras palabras, la afinidad de la variante por C1q es menor que la del polipéptido progenitor.

El polipéptido variante según la presente invención también exhibe una afinidad por al menos un receptor Fc γ menor que la de su polipéptido progenitor. Como se usa aquí, los receptores Fc γ incluyen los receptores Fc γ RI, Fc γ RIII y Fc γ RII. Preferiblemente, el al menos un Fc γ R se selecciona del grupo que consiste en Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIa, Fc γ RI y Fc γ RIIb.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido variante exhibe una unión reducida tanto a C1q como a Fc γ RIIIa, en comparación con su progenitor polipeptídico.

En ciertas realizaciones, el polipéptido variante exhibe una unión reducida a C1q, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIa, en comparación con su progenitor polipeptídico.

50 En otras realizaciones, el polipéptido variante exhibe una unión reducida a C1q, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIa y Fc γ RI, en comparación con su progenitor polipeptídico.

En otras realizaciones, el polipéptido variante exhibe una unión reducida a C1q, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIa, Fc γ RI y Fc γ RIIb, en comparación con su progenitor polipeptídico.

La unión para C1q o para cualquiera de los receptores Fc gamma se puede evaluar mediante métodos bien conocidos de la técnica anterior, tales como ensayo ELISA, citometría de flujo, y resonancia de plasmones de superficie (SPR).

5 Por ejemplo, la fortaleza de enlace de una variante de la invención por una proteína de interés (tal como C1q o un FcγR) se puede comparar con la de su polipéptido progenitor calculando la relación de sus señales específicas obtenidas mediante ensayo ELISA, como se describe en la sección III del ejemplo. Como se usa aquí, una variante exhibe una unión reducida por una proteína de interés, tal como C1q o FcγR, en comparación con su polipéptido progenitor, si la relación obtenida dividiendo la señal específica de dicha variante entre la del polipéptido progenitor es menor que 0,50, determinándose las mencionadas señales específicas mediante ensayo ELISA. En otras palabras, la señal específica de la variante es 0,50 veces menor que la señal específica de su polipéptido progenitor. Una relación menor que 0,50 incluye una relación menor que 0,45, menor que 0,40, menor que 0,35, menor que 0,30, menor que 0,25, menor que 0,20, menor que 0,15, menor que 0,10, menor que 0,05, menor que 0,01.

En una realización preferida, la relación es menor que 0,20.

El formato preferido para el ensayo ELISA comprende el revestimiento de la proteína de interés.

15 Como alternativa, la unión de la variante y la de su progenitor polipeptídico para una proteína de interés se puede comparar a través de la determinación de EC50 mediante un ensayo ELISA apropiado. La EC50 se refiere a la concentración de la variante que proporciona una señal que representa 50% de la saturación de la curva que se refiere al porcentaje de proteína unida de interés frente al logaritmo de la concentración de la variante. En general, se admite que una variante presenta una unión reducida a una proteína de interés, en comparación con su progenitor polipeptídico, si EC50 es al menos 1,5 veces mayor que la de su progenitor polipeptídico.

La afinidad de unión de la variante a una proteína de interés también se puede evaluar mediante SPR a través de la determinación de la constante de disociación (KD). Generalmente se admite que una variante presenta una unión reducida a una proteína de interés, en comparación con su progenitor polipeptídico, si su KD es al menos 1,5 veces mayor que la de su progenitor polipeptídico

25 La afinidad de la variante por C1q o por un FcγR puede ser tan débil que la señal específica mediante el ensayo ELISA, e incluso la KD mediante SPR, o la EC50 mediante ensayo ELISA, no se puede determinar de forma exacta puesto que la señal de unión está en el ruido de fondo o por debajo el umbral de detección. En tal caso, se considera que la variante no se une a la proteína de interés.

30 Por ejemplo, la variante obtenida mediante el método según la invención puede no unirse a al menos un FcγR y exhibe una unión reducida a C1q. Tal variante se ilustra claramente en los ejemplos de la presente solicitud.

En algunas realizaciones, la variante de la invención no se une a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fcγ.

35 El solicitante mostró que la introducción de 294Del es suficiente para alterar significativamente la unión a C1q y a receptores Fcγ. En otras palabras, no se ha de introducir ninguna mutación distinta de 294Del en la región Fc del progenitor polipeptídico a fin de obtener una variante con unión reducida apropiada a C1q y/o a receptores Fcγ.

Tal resultado es particularmente sorprendente puesto que, según el conocimiento del solicitante, la técnica anterior describe mayoritariamente variantes Fc que presentan unión reducida tanto a C1q como a receptores Fcγ, que tienen al menos dos modificaciones de aminoácido en su región Fc en comparación con su progenitor polipeptídico.

40 En algunas realizaciones, la mutación 294Del es así la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor para obtener la mencionada variante.

En algunas otras realizaciones, la mutación 293Del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor para obtener la mencionada variante.

En algunas otras realizaciones, la modificación de aminoácido del293/del294 es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor para obtener la mencionada variante.

45 En consecuencia, ciertas realizaciones de la invención engloban un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y/o a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:

50 (i) 294del, en la que dicha modificación de aminoácido 294del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor,

(ii) 293del, y

(iii) 293del/294del,

en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.

5 Otras realizaciones de la invención engloban un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y/o a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:

(i) 294del, en la que dicha modificación de aminoácido 294del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor,

10 (ii) 293del, en la que dicha modificación de aminoácido 293del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor, y

(iii) 293del/294del,

en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.

15 En realizaciones particulares, el método de la invención proporciona variantes que son diferentes de la variante que consiste en E294Del/T307P/N434Y

20 Sin estar atados por ninguna teoría, el solicitante cree que el método proporcionado por la presente invención no causa significativamente un reajuste estructural importante en la región Fc, de manera que, en algunos casos, las otras funciones que no están mediadas por la unión a C1q y a FcγRs no se ven alteradas significativamente en comparación con las del progenitor polipeptídico. Ciertamente, el solicitante mostró para diversos polipéptidos progenitores distintos que la introducción de la mutación 294Del en su región Fc no altera significativamente su afinidad por el receptor Fc neonatal (FcRn). Por ejemplo, la señal específica de la variante de IgG1 256N/294Del/378V/383N/434Y es igual a 0,75 veces la de su progenitor polipeptídico 256N/378V/383N/434Y, y la señal específica de la variante de IgG1 307A/294Del es igual a 0,97 veces la de su progenitor polipeptídico 307A. Claramente, dichas variantes exhiben una mayor unión a FcRn en comparación con IgG1 de tipo salvaje (véase la tabla 1-4 en el ejemplo). En otras palabras, en algunos casos, el progenitor polipeptídico Fc y la variante obtenida mediante el método de la presente invención pueden presentar una propiedad de unión próxima por FcRn.

25 Como se usa aquí, la variante obtenida mediante el método de la presente invención tiene una unión a FcRn próxima a la de su progenitor polipeptídico cuando la señal específica de la variante es al menos igual a 0,6 veces la de su polipéptido progenitor, determinándose las señales específicas a través de un ensayo ELISA en el que moléculas de FcRn se inmovilizan preferiblemente como se describe en la sección III del ejemplo. Por al menos igual a 0,6 veces, se quiere decir aquí 0,6 veces, 0,65 veces, 0,70 veces, 0,75 veces, 0,80 veces, 0,85 veces, 0,90 veces y 0,95 veces.

30 Como se menciona aquí anteriormente, la región Fc del polipéptido progenitor se puede seleccionar del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de IgGs humanas, fragmentos y mutantes de las mismas.

Las regiones Fc de tipo salvaje de IgGs humanas engloban el polipéptido de SEQ ID N°1, polipéptido de SEQ ID N°2, polipéptido de SEQ ID N°3, polipéptido de SEQ ID N°4, polipéptido de SEQ ID N°5.

35 En una realización preferida, la región Fc del polipéptido progenitor se selecciona del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de IgG1 e IgG2, fragmentos y mutantes de las mismas. En una realización más preferida, la región Fc del progenitor polipeptídico es una región Fc de una IgG1 humana de tipo salvaje, fragmentos y mutantes de la misma.

40 Como se indica aquí anteriormente, la región Fc del polipéptido progenitor puede comprender modificaciones de aminoácidos preexistentes seleccionados de supresión, inserción y sustitución de uno o más aminoácidos. En otras palabras, la región Fc del polipéptido progenitor puede ser un mutante de una región Fc de tipo salvaje, preferiblemente un mutante de una región Fc de tipo salvaje de IgGs humanas, a saber, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

45 En alguna realización, la región Fc del progenitor polipeptídico comprende de alrededor de 1 a alrededor de 20 mutaciones de aminoácidos, preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 10 mutaciones de aminoácidos, en comparación con su región Fc de tipo salvaje correspondiente.

50 De alrededor de 1 a alrededor de 20 mutaciones de aminoácidos engloba 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mutaciones de aminoácidos.

La región Fc del progenitor polipeptídico tiene generalmente al menos alrededor de 90% de identidad de aminoácidos con su región Fc de tipo salvaje correspondiente. Al menos alrededor de 90% de identidad de aminoácidos engloba al menos alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 99,5%.

Para determinar el porcentaje de identidad entre un primer polipéptido (A) y un segundo polipéptido (B), se alinean sus secuencias usando métodos bien conocidos de la técnica anterior, tal como el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch, teniendo en cuenta los espacios eventuales (es decir, las supresiones e inserciones eventuales presentes en la secuencia del polipéptido (A) en comparación con el polipéptido (B)). Se puede usar la herramienta de alineamiento "EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms", disponible del sitio web de EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/), con los siguientes parámetros: (i) Método: EMBOSS: Needle (global); (ii) Extensión del espacio: 0,5; (iii) Apertura del espacio: 10,0; (iv) Molécula: proteína; (v) Matriz: Blosum62.

Una vez que se obtiene el alineamiento global, el porcentaje de identidad se puede determinar mediante métodos convencionales, preferiblemente dividiendo el número de restos emparejados que resultan del alineamiento de (A) y (B) entre el número de aminoácidos en la secuencia del polipéptido más largo entre (A) y (B).

Cuando el polipéptido progenitor comprende mutaciones de aminoácidos preexistentes, el mencionado polipéptido progenitor puede presentar una o más funciones efectoras disminuidas o incrementadas en comparación con su polipéptido de referencia, es decir, un polipéptido similar que comprende la región Fc de tipo salvaje. Como se usa aquí, las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, ADCC, ADCP, CDC, y unión a FcRn.

El experto en la técnica puede referirse a estudios previos para determinar las mutaciones de aminoácidos preexistentes que pueden estar presentes en el polipéptido progenitor dependiendo del perfil de funciones efectoras que se busca. Por ejemplo, el polipéptido progenitor puede comprender al menos una mutación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada de 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 301, 302, 303, 305, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc, en el que la numeración de aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.

El polipéptido progenitor también puede comprender solamente una mutación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada de 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc, en el que la numeración de aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat. "Solamente una mutación de aminoácido" significa que el polipéptido progenitor no contiene más de una mutación en las posiciones citadas aquí anteriormente. Por ejemplo, el polipéptido progenitor no comprende modificaciones de aminoácido tanto en las posiciones 307 como 434 de la región Fc. En consecuencia, en la realización del método en el que la única mutación introducida en la región Fc del progenitor polipeptídico es 294Del o 293Del, la variante resultante no puede comprender más de una mutación de aminoácido en las posiciones de aminoácidos citadas aquí anteriormente, en particular la variante no comprende mutaciones de aminoácido tanto en las posiciones 307 como 434 de la región Fc, correspondiendo la numeración de aminoácidos en la región Fc a la del índice EU, o equivalente en Kabat.

En consecuencia, ciertas realizaciones de la invención engloban un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fcγ en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 294Del o 293Del y 293Del/294Del en la región Fc del polipéptido progenitor, con la condición de que la variante resultante no comprenda las mutaciones 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y.

En otras realizaciones, la invención engloba un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fcγ en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 294Del o 293Del y 293Del/294Del en la región Fc del polipéptido progenitor, con la condición de que la variante resultante no consista en las variantes 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y.

Otras realizaciones de la invención engloban un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a al menos una proteína seleccionada de C1q y receptores Fcγ en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 294Del o 293Del y 293Del/294Del en la región Fc del polipéptido progenitor, con la condición de que dicha variante del polipéptido progenitor no comprenda una modificación de aminoácido que consiste en 294Del o 293Del combinada con mutaciones tanto en las posiciones 307 como 434, refiriéndose la numeración de aminoácido en la región Fc a la numeración según el índice EU, o equivalente en Kabat. De la misma manera, el progenitor polipeptídico puede comprender o no al menos una modificación de aminoácido en las posiciones desde 290 hasta 292 y desde 295 hasta 300 de la región Fc, en las que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.

En consecuencia, en algunas realizaciones, el progenitor polipeptídico no comprende modificaciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos desde 290 hasta 292 y desde 295 hasta 300 de la región Fc, en las que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.

5 Las posiciones de aminoácidos desde 290 hasta 292 y desde 295 hasta 300 engloban 290, 291, 292, 295, 296, 297, 298, 299 y 300.

En otras realizaciones, el progenitor polipeptídico no comprende ninguna mutación en su región Fc en comparación con regiones Fc de tipo salvaje. En tales realizaciones, el polipéptido progenitor comprende una región Fc seleccionada del grupo que consiste en regiones Fc de tipo salvaje de IgGs humanas, y fragmentos de las mismas.

10 Como recordatorio, las regiones Fc de tipo salvaje de IgGs humanas engloban la región Fc de SEQ ID N°1, la región Fc de SEQ ID N°2, la región Fc de SEQ ID N°3 y la región Fc de SEQ ID N°4.

En algunas otras realizaciones, la región Fc del polipéptido progenitor es una variante de una región Fc de IgG de tipo salvaje que comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada de 434Y, 378V, 397M, 302A, 434S, 315D, 230S, 307A, 228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y y 256N/378V/383N/434Y.

15 En ciertas realizaciones, la región Fc del polipéptido progenitor es una variante de una región Fc de IgG de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en 434Y, 378V, 397M, 302A, 434S, 315D, 230S, 307A, 228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y y 256N/378V/383N/434Y.

En una realización específica, el método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, se caracteriza por que:

20 (i) se introduce en la región Fc del polipéptido progenitor una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del,

(ii) la modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor para obtener la mencionada variante, y

25 (iii) la región Fc del polipéptido progenitor se selecciona del grupo de regiones Fc de tipo salvaje de IgGs y fragmentos de las mismas;

refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.

En alguna realización, la etapa de introducir una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en la región Fc del polipéptido progenitor comprende las etapas de:

30 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica el polipéptido progenitor,

(b) modificar el ácido nucleico proporcionado en la etapa (i) para obtener un ácido nucleico que codifica la mencionada variante, y

(c) expresar el ácido nucleico obtenido en la etapa (ii) en una célula hospedante y recuperar la mencionada variante.

35 En alguna realización del método según la invención, la modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor es 294Del. En otras realizaciones, la mencionada modificación es 293Del.

40 Tal método se puede llevar a cabo mediante prácticas convencionales de biología molecular. Para llevar a cabo el método de la invención, el experto en la técnica puede referirse a procedimientos bien conocidos descritos en la técnica anterior, que se pueden encontrar, por ejemplo, en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual (Sambrook, Russell, CSHL Press, 2006), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 2004).

45 El ácido nucleico del polipéptido progenitor puede ser comercial, o se puede obtener mediante procedimiento clásico de biología molecular o síntesis química. El ácido nucleico que codifica la variante como se menciona en la etapa (b) se puede lograr modificando el ácido nucleico del polipéptido progenitor usando una variedad de métodos conocidos en la técnica anterior. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis al azar, mutagénesis mediante PCR y mutagénesis en casete.

El ácido nucleico que codifica la mencionada variante se puede incorporar en un vector de expresión con vistas a su expresión en una célula hospedante.

Los vectores de expresión incluyen típicamente una proteína enlazada operablemente, esto es, colocada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualesquiera parejas de fusión, y/o elementos adicionales. La variante de la presente invención se puede producir cultivando una célula hospedante transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica la variante, en las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Se puede usar una amplia variedad de estirpes de células hospedantes apropiadas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamífero, células vegetales, bacterias, células de insecto, y levadura. También se puede lograr la síntesis in vitro en sistemas de traducción libres de células, incluyendo, pero sin limitarse a, extractos de reticulocitos de conejo, germen de trigo y *Escherichia coli*.

Por ejemplo, una variedad de estirpes celulares de mamífero que pueden encontrar uso se describen en el catálogo de estirpes celulares de la ATCC, disponible de la American Type Culture Collection. Las células hospedantes pueden ser, pero sin limitarse a, YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.GII.IGAg.20, depósito en la American Type Culture Collection, ATCC nº CRL-1662), SP2/0, YE2/0, 1R983F, Namalwa, PERC6, estirpes celulares de CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-Lecl0, CHO-Lecl, CHO-Lecl3, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, KGH6, NSO, SP2/0-Ag 14, P3X63Ag8.653, C127, JC, LA7, ZR-45-30, hTERT, NM2C5, UACC-812, y similares. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células hospedantes son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula hospedante usada.

La célula hospedante puede pertenecer a un animal no humano transgénico o a una planta transgénica per se. En este caso, la variante se obtiene así de un organismo transgénico.

Un animal no humano transgénico se puede obtener inyectando directamente un gen deseado en un óvulo fertilizado (Gordon et al., 1980 Proc Natl Acad Sci U S A.; 77:7380-4). Los animales no humanos transgénicos incluyen ratón, conejo, rata, cabra, vaca, ganado vacuno o ave de corral, y similares. Un animal no humano transgénico que tiene un gen deseado se puede obtener introduciendo el gen deseado en una célula madre embrionaria, y preparando el animal mediante un método de quimeras de agregación o mediante un método de quimeras por inyección (Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)). Los ejemplos de la célula madre embrionaria incluyen células madre embrionarias de ratón (Evans y Kaufman, 1981, Nature; 292:154-156), rata, cabra, conejo, mono, ave de corral, ganado vacuno, y similar. Además, un animal no humano transgénico también se puede preparar usando una técnica de clonación en la que se transplante un núcleo en el que se introduce un gen deseado, en un óvulo enucleado (Ryan et al., 1997 Science; 278: 873 - 876; Cibelli et al., 1998 Science, 280: 1256-1258). La variante polipeptídica se puede producir introduciendo ADN que codifica la molécula variante en un animal preparado mediante el método anterior, para formar de ese modo y acumular la molécula variante en el animal, y recogiendo entonces la variante polipeptídica del animal. La variante polipeptídica se puede obtener para que se forme y se acumule en la leche, huevo, o similar, del animal.

En todas las realizaciones citadas anteriormente, el polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (polipéptido de tipo salvaje), una variante, o una versión manipulada mediante ingeniería de un polipéptido de origen natural, o un polipéptido sintético.

En algunas realizaciones, el polipéptido progenitor se selecciona del grupo que consiste en proteína de fusión con Fc, conjugado con Fc, y anticuerpos.

Como se usa aquí, proteína de fusión con Fc y conjugado con Fc consiste en una región Fc enlazada a una pareja. La región Fc se puede enlazar a su pareja con o sin un espaciador.

Según la presente invención, una proteína de fusión con Fc es una proteína codificada mediante un único gen, y comprende una proteína, un polipéptido o un péptido pequeño enlazado a una región Fc. Una proteína de fusión con Fc comprende opcionalmente un espaciador peptídico. Virtualmente se puede enlazar cualquier proteína o péptido pequeño a regiones Fc para generar una fusión con Fc. Las parejas de las proteínas de fusión pueden incluir, pero no se limitan a, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina, o alguna otra proteína o dominio proteico.

En particular, la proteína de fusión con Fc puede ser una inmunoadhesina, es decir, proteína similar a anticuerpo que combina el dominio de unión de una proteína de "adhesión" heteróloga (es decir, receptor, ligando o enzima) con un fragmento de un dominio constante inmunoglobulínico (es decir, una región Fc) (para un repaso sobre inmunoadhesinas, véase Ashkenazi A, Chamow SM. 1997, Curr Opin Immunol.; 9(2):195-200).

El péptido pequeño puede incluir, pero no se limita a, cualquier agente terapéutico que dirija la fusión con Fc hacia una diana terapéutica.

Según la presente invención, un conjugado de Fc resulta del acoplamiento químico de una región Fc con una pareja del conjugado, y opcionalmente comprende un espaciador que enlaza la región Fc a la pareja del conjugado. La pareja del conjugado puede ser proteinosa o no proteinosa. La reacción de acoplamiento usa generalmente grupos funcionales en la región Fc y en la pareja del conjugado.

Las parejas del conjugado adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos terapéuticos, marcadores (para ejemplo de marcadores, véase adicionalmente más abajo), fármacos, agentes citotóxicos, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), toxinas y fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen, pero no se limitan a, cadena A de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, y similares. Un agente citotóxico puede ser cualquier radionúclido que se puede conjugar directamente a la variante Fc, o que puede ser secuestrado mediante un agente quelante que está unido covalentemente a la variante Fc. En realizaciones adicionales, las parejas del conjugado se pueden seleccionar del grupo que consiste en caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, y duocarmicinas y análogos.

Como se ha mencionado, el término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio. Según la presente invención, "anticuerpo" se refiere a cualquier polipéptido que al menos comprende (i) una región Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. El mencionado dominio polipeptídico de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana dado o a un grupo de antígenos diana. Un dominio polipeptídico de unión que deriva de una región variable de una inmunoglobulina comprende al menos una o más CDRs. Aquí, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos multiespecíficos, proteína de fusión con Fc que comprende al menos una región variable o anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados aquí como "miméticos de anticuerpos"), proteínas de fusión con anticuerpos, conjugados de anticuerpos, y fragmentos de cada uno respectivamente.

Por proteína de fusión con Fc que comprende al menos una región variable se quiere decir una proteína modificada mediante ingeniería que comprende (i) una región Fc y (ii) un dominio polipeptídico de unión derivado de un dominio variable de una inmunoglobulina. Son de particular interés los anticuerpos que comprenden (a) una variante Fc de la invención, y (b) uno de los siguientes dominios polipeptídicos de unión derivados de una región variable de una inmunoglobulina (es decir, que comprende al menos una CDR): (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) regiones CDR aisladas, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vi) moléculas de Fv monocatenario (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están enlazados mediante un enlazador peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a antígeno, (vii) Fv monocatenario biespecífico, y (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica, no siendo la lista limitativa.

Por "anticuerpo de longitud completa" se quiere decir aquí un anticuerpo que tiene una forma biológica de origen natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes. Un anticuerpo de longitud completa puede ser un anticuerpo de tipo salvaje, un mutante de un anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo, que comprende modificaciones preexistentes), una versión manipulada mediante ingeniería de un anticuerpo de tipo salvaje (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo totalmente humano; véase adicionalmente más abajo), no siendo esta lista limitativa. Como es bien conocido, la estructura de un anticuerpo de longitud completa es generalmente un tetrámero, excepto para algunos mamíferos, tales como llamas y camellos, en los que algunas inmunoglobulinas son dímeros.

Los componentes del armazón del anticuerpo de longitud completa pueden ser una mezcla de diferentes especies. Tal variante de anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones procedentes de más de una especie. Por ejemplo, "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente región o regiones variables de un animal no humano, generalmente el ratón (o rata, en algunos casos), y región o regiones constantes procedentes de un ser humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDRs, es codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a un anticuerpo humano, excepto en sus CDRs. Las CDRs, algunas de las cuales o todas son codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDRs injertadas. El método para preparar tales anticuerpos es bien conocido, y se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018; Jones, 1986, Nature 321:522-525; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536, Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA)).

Como se usa aquí, "anticuerpo totalmente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo que comprende enteramente secuencias que se originan a partir de genes humanos. En algunos casos, esto puede ser anticuerpos humanos que tienen la secuencia génica de un anticuerpo derivada de un cromosoma humano con las modificaciones resumidas aquí. Como alternativa, los componentes del anticuerpo pueden ser humanos, pero pueden no derivar de un único gen. De este modo, por ejemplo, las CDRs humanas procedentes de un anticuerpo se pueden combinar con secuencias, tales como secuencias de estructura, procedentes de uno o más anticuerpos humanos. Por ejemplo, se puede combinar una variedad de secuencias de línea germinal para formar un anticuerpo humano o un armazón humano.

Los anticuerpos de longitud completa que comprenden modificaciones covalentes también están incluidos dentro del alcance de esta invención. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glicosilaciones, marcaje y conjugación.

5 El marcaje se refiere al acoplamiento de un marcador detectable con el anticuerpo de longitud completa. Como se usa aquí, un marcador incluye, sin limitarse a: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) colorantes ópticos tales como cromóforos, fósforos y fluoróforos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas, etc.).

10 La conjugación se refiere al acoplamiento del anticuerpo de longitud completa con un polipéptido o una molécula no peptídica tal como una región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina, un fármaco, un agente citotóxico (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o una toxina.

15 En cierta realización, el progenitor polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas quiméricas, inmunoglobulinas humanizadas, inmunoglobulinas totalmente humanas, inmunoglobulinas que se seleccionan preferiblemente entre IgGs y opcionalmente conjugadas o marcadas.

c. Variantes de la invención

20 Otro objeto de la presente invención es una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, que exhibe unión reducida a al menos una proteína seleccionada de la proteína C1q y a al menos un receptor Fc γ R escogido de Fc γ RII y Fc γ RIII en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprende una modificación de aminoácido que consiste en 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico. Dicha variante se puede obtener mediante el método de la invención.

25 La mencionada variante exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor Fc γ R escogido de Fc γ RII y Fc γ RIII en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y comprende una modificación de aminoácido que consiste en 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico.

La mencionada variante exhibe unión reducida a C1q y a al menos un receptor Fc γ en comparación con el mencionado polipéptido progenitor.

30 En algunas realizaciones, la mutación 294Del es la única mutación que contiene la región Fc de la variante, en comparación con la región Fc del polipéptido progenitor.

En otras realizaciones, la mutación 293Del es la única mutación que contiene la región Fc de la variante, en comparación con la región Fc del polipéptido progenitor.

En algunas otras realizaciones, la modificación de aminoácido 293Del/294Del es la única modificación que contiene la región Fc de la variante, en comparación con la del polipéptido progenitor.

35 Las propiedades estructurales y funcionales de las mencionadas variantes se deducen directamente de las características del método usado para prepararlas, describiéndose dicho método totalmente en la parte b. titulada "Método para disminuir la unión de Fc a C1q y Fc γ Rs".

40 Se debería subrayar que las propiedades de la variante se pueden deducir generalmente a partir de las del polipéptido progenitor excepto en términos de unión a C1q y receptores Fc γ , puesto que la unión de la variante a C1q y a Fc γ Rs está controlada por la modificación de aminoácido en la posición 294 y/o en la posición 293.

En consecuencia, en algunas realizaciones, el polipéptido variante exhibe una unión reducida a C1q y a al menos un receptor Fc γ seleccionado de Fc γ RIIIa, Fc γ RIIa, Fc γ RI y Fc γ RIIb, en comparación con su progenitor polipeptídico.

45 Como se usa aquí, una variante exhibe una unión reducida a una proteína de interés, tal como C1q o Fc γ R, en comparación con su polipéptido progenitor, si la relación obtenida dividiendo la señal específica de dicha variante entre aquella del polipéptido progenitor es menor que 0,5, determinándose las mencionadas señales específicas mediante ensayo ELISA. En otras palabras, la señal específica de la variante es como máximo igual a 0,5 veces la señal específica de su polipéptido progenitor.

50 La región Fc de la variante puede comprender una o más modificaciones de aminoácido distintas de 294Del y 293Del, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje. En general, la región Fc de la variante comprende de alrededor de 1 a alrededor de 21 modificaciones de aminoácido, preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 11 modificaciones de aminoácido, en comparación con su región Fc de tipo salvaje correspondiente, incluyendo la mencionada modificación 294Del, 293Del o 293Del/294Del.

- De forma similar al polipéptido progenitor, la variante puede comprender además al menos una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada de 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 301, 302, 303, 305, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.
- La variante también puede comprender solamente una modificación de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada de 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat. "Solamente una modificación de aminoácido" significa que la variante no contiene más de una modificación en las posiciones citadas aquí anteriormente. Por ejemplo, la variante no comprende modificaciones de aminoácido tanto en las posiciones 307 como 434 de la región Fc, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje. En consecuencia, en ciertas realizaciones de la invención, la variante no comprende la modificación de aminoácido que consiste en 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y. En realizaciones particulares de la invención, la variante no consiste en las variantes 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y.
- En otras realizaciones de la invención, la variante no comprende una modificación de aminoácido que consiste en 294del o 293del combinada con mutaciones tanto en las posiciones 307 como 434. Por lo tanto, una realización de la invención consiste en una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc, que exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprende una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico, con la condición de que dicha variante del polipéptido progenitor no comprenda una modificación de aminoácido que consiste en 294del o 293del combinada con mutaciones en las posiciones tanto 307 como 434.
- En algunas realizaciones, la variante de la invención comprende además al menos una modificación de aminoácido seleccionada de 378V, 434Y, 397M, 302A, 434S, 315D, 230S, 307A, 228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y, y la modificación de aminoácido 256N/378V/383N/434Y, en la región Fc.
- En algunas realizaciones específicas, la región Fc de la variante de la invención es una variante de una región Fc de IgG de tipo salvaje que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en 294Del, 293Del, 293Del/294Del, 294Del/256N/378V/383N/434Y, 294Del/259I/315D/434Y, 294Del/397M, 294Del/302A, 294Del/434S, 294Del/315D, 294Del/230S, 294Del/307A, 294Del/228R, 230S/315D/428L/434Y, 294Del/378V y 294Del/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.
- De la misma manera, la variante puede comprender o no una modificación de aminoácido en cualquiera de las posiciones desde 290 hasta 292 y desde 295 y 300 de la región Fc, en comparación con regiones Fc de tipo salvaje, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o su equivalente en Kabat.
- En ciertas realizaciones, la variante no comprende ninguna mutación distinta de 294Del o 293Del en su región Fc que pueda disminuir la unión a C1q y a al menos un FcγR en comparación con regiones Fc de tipo salvaje.
- En otras realizaciones, la variante no comprende ninguna mutación distinta de 294Del o 293Del en su región Fc en comparación con regiones Fc de tipo salvaje.
- En algunas realizaciones, la región Fc de la variante deriva de regiones Fc de tipo salvaje de IgGs.
- En algunas otras realizaciones, la región Fc de la variante se selecciona del grupo de variantes de regiones Fc de tipo salvaje de IgGs que consisten en 293Del, 294Del, 293Del/294Del, 378V/294Del, 434Y/294Del, 294Del/397M, 294Del/302A, 294Del/434S, 294Del/315D, 294Del/230S, 294Del/307A, 294Del/228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y/294Del y 256N/378V/383N/434Y/294Del, en las que la numeración de los aminoácidos se refiere a la numeración de los aminoácidos de Fc del índice EU, o equivalente en Kabat.
- En otras realizaciones, la variante se selecciona del grupo que consiste en proteínas de fusión con Fc, conjugados con Fc y anticuerpos.
- En algunas realizaciones, la variante es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en inmunoglobulinas quiméricas, inmunoglobulinas humanizadas e inmunoglobulinas totalmente humanas, seleccionándose las inmunoglobulinas preferiblemente entre las IgGs.

Un objeto adicional de la invención es un ácido nucleico aislado que codifica una variante como se define aquí anteriormente. La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la mencionada variante, y a una célula hospedante que comprende el mencionado vector. En una realización preferida, el ácido nucleico que codifica el mencionado vector se ha integrado de forma estable en el genoma de la célula hospedante. La invención también se refiere a un animal transgénico no humano que comprende el mencionado ácido nucleico o el mencionado vector integrado de forma estable en su genoma.

d. Usos del método y de las variantes según la invención

El solicitante mostró que la mutación 294Del de la región Fc altera drásticamente la afinidad de la variante Fc por C1q y por receptores Fcγ tales como FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIIb y FcγRIIIa. La disminución en la afinidad por estas moléculas efectoras es tan importante que, en algunos casos, no se puede observar *in vitro* mediante ensayo ELISA convencional la unión de la variante Fc a C1q y/o a ciertos FcγRs. La unión de la región Fc a C1q es esencial para la inducción de CDC *in vivo*. De la misma manera, la unión de la región Fc a FcγRIIIa y a FcγRIIIa es una etapa clave para la inducción de ADCC y ADCP *in vivo*.

En consecuencia, debido a la mala afinidad por C1q, se anticipa que las variantes de la invención no tienen actividad de CDC, o inducen una respuesta de CDC significativamente inferior *in vivo*, en comparación con sus polipéptidos progenitores, y generalmente con polipéptidos que comprenden una región Fc sin la mutación 294Del o la mutación 293Del. De la misma manera, debido a la mala afinidad por ciertos FcγRs (en particular FcγRIIIa y FcγRIIIa), se anticipa que las variantes de la invención no tienen actividad de ADCC, o inducen una respuesta de ADCC significativamente inferior *in vivo*, en comparación con sus polipéptidos progenitores, y generalmente con polipéptidos que comprenden una región Fc sin la mutación 294Del o la mutación 293Del. También se espera el mismo resultado para ensayos de ADCC y CDC *in vitro*.

De hecho, se ha mostrado por el solicitante que la variante de IgG1 obtenida introduciendo 294Del en la secuencia de aminoácidos de una IgG1 que comprende una región Fc de tipo salvaje (es decir, una región Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1) no presenta actividad de ADCC y/o de CDC, o presenta actividad reducida.

Ciertamente, la introducción de la mutación 294Del también permitió limitar o abolir actividades de ADCC y/o CDC, a la vez que preservan preferentemente la afinidad por FcRn en polipéptidos IgG1 manipulados inicialmente mediante ingeniería para exhibir una mayor afinidad por FcRn en comparación con IgG1 de tipo salvaje.

Por ejemplo, la variante de IgG1 que tiene las mutaciones 294Del/256N/378V/383N/434Y no presentó actividad de ADCC ni de CDC, pero presenta una afinidad por FcRn al menos similar a su progenitor de IgG1 (véanse los resultados de ELISA y de SPR en las secciones III y IV del ejemplo).

Se obtuvieron resultados similares para la variante 294Del/259I/315D/434Y en comparación con su polipéptido progenitor que comprende la modificación de aminoácido 259I/315D/434Y.

Debido a sus perfiles de actividad efectora, las variantes de la invención pueden encontrar uso en un amplio intervalo de campos científicos. En particular, las variantes de la invención se pueden usar como reactivos de investigación, agentes de diagnóstico o sustancias terapéuticas.

Por ejemplo, las variantes se pueden marcar con un fluoróforo o con un isótopo tal como indio-111 o tecnecio-99m, y se pueden usar para formación de imágenes *in vivo* puesto que, en tal aplicación, no se requiere la activación de ADCC o de CDC.

Cuando se usa como sustancia terapéutica, la variante se puede usar para transportar un agente terapéutico, tales como radionúclidos, toxinas, citocinas o enzimas, a una célula diana, por ejemplo una célula cancerosa. En este caso, la variante puede ser un conjugado entre un anticuerpo y el agente citotóxico, y su actividad terapéutica se basa en el agente citotóxico (por ejemplo Gilliland et al., PNAS, 1980, 77, 4539-4543).

Las variantes polipeptídicas también pueden funcionar como agentes bloqueantes o neutralizantes de una molécula diana, pero que no exterminan a las células que poseen el antígeno diana. También pueden agonizar, antagonizar o inhibir una molécula diana.

En estos casos, es indeseable el agotamiento de células diana, y se puede considerar un efecto secundario. Por ejemplo, la capacidad de los anticuerpos anti-CD4 para bloquear receptores CD4 en células T los hacen agentes antiinflamatorios eficaces, aunque su capacidad para reclutar FcγRs también dirige el ataque inmune contra las células diana, dando como resultado el agotamiento de células T. La función efectora también puede ser un problema para anticuerpos radiomarcados, denominados como radioconjugados, y anticuerpos conjugados a toxinas, denominados como inmunotoxinas. Estos fármacos se pueden usar para destruir células cancerosas, pero el reclutamiento de células inmunes vía la interacción de Fc con FcγRs conduce a las células inmunes sanas próximas a la carga mortal (radiación o toxina), dando como resultado el agotamiento de tejido linfóide normal junto con células cancerosas diana. También se ha mostrado por el solicitante que la variante según la invención, a la vez que exhibe una unión alterada a C1q y a al menos un receptor Fcγ, presenta otras características

funcionales similares, tal como el reconocimiento antigénico o afinidad por FcRn. Por lo tanto, no se perturban otras propiedades importantes del anticuerpo, tal como la estabilidad del anticuerpo, la integridad estructural, o la capacidad para interactuar con otros ligandos de Fc importantes tales como FcRn y proteínas A y G.

5 La molécula diana puede ser de cualquier tipo, e incluye moléculas tanto exógenas como endógenas. Las moléculas diana (también denominadas antígenos cuando la variante polipeptídica es un anticuerpo) incluyen, sin limitarse a, proteínas víricas, bacterianas y fúngicas, priones, toxinas, enzimas, receptores de membrana, fármacos, y proteínas solubles.

10 Los receptores de membrana incluyen, sin limitarse a, antígeno RhD, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD32B, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD71 (receptor de transferrina), CD80, CD86, CTLA-4, CD147, CD160, CD224, receptores de factores de crecimiento como los que pertenecen a la familia ErbB de receptores ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 (EGFR, HER2/neu, HER3, HER4), VEGF-R1, VEGF-R2, IGF-R1, PIGF-R, moléculas de MHC clase I y de MHC clase II, por ejemplo HLA-DR, receptor de interferón tipo I, receptores de interleucinas como IL-1R, IL-2R alfa, IL-2R beta y IL-2R gamma, IL-6R, receptores de hormonas como el receptor de la sustancia inhibidora de Müllerian tipo II, receptor de LDL, NKp44L, receptores de quimiocinas como CXCR4, CCR5, TNFR, CD137, integrinas, moléculas de adhesión como CD2, ICAM, EpCAM, receptor acoplado a proteína G,

20 Las proteínas de membrana también incluyen marcadores tumorales como GD2, GD3, CA125, MUC-1, MUC-16, antígeno carcinoembrionario (CEA), Tn, glicoproteína 72, PSMA, HMW-MAA, otras proteínas tales como BDCA-2 específica para células DC, péptidos similares a glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, factor activante de plaquetas, acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucinas y a citocinas (por ejemplo, IL-18 pb, proteína de unión a TNF, etc.), factor activante de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales.

25 Las proteínas solubles incluyen, sin limitarse a, citocinas, tales como, por ejemplo, IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, IL-23, TGF beta, TNF alfa, IFN gamma, quimiocinas, factores de crecimiento como VEGF, G-CSF, GM-CSF, EGF, PIGF, PDGF, IGF, hormonas, y anticuerpo inhibidor tal como un inhibidor de FVIII, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina muy glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, antitrombina III, péptido activante del receptor de trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activante de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína reactiva C, receptor del factor activante de células B, antagonistas de receptores (por ejemplo, IL1-Ra), proteínas del complemento, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, factor H, factor I, factor P, otras proteínas tales como CSAP, ligando de CD137, lectinas, proteínas sialiladas.

35 Las variantes según la invención se pueden usar para la neutralización de toxinas microbianas (tal como toxina del tétano o carbunco), o para prevenir infección vírica tal como hepatitis, infecciones mediadas por el virus del papiloma o el virus sincitial respiratorio. Los agentes neutralizantes según la invención también se pueden usar en caso de envenenamiento. Finalmente, las variantes neutralizantes según la invención también se pueden dirigir contra auto-antígenos, tales como VEGF, para el tratamiento de cáncer u otras patologías, tal como degeneración macular debido a la edad.

40 Las variantes según la invención también se pueden usar para antagonizar un receptor de membrana tal como receptores de citocinas, receptores de factores de crecimiento, integrinas. Por ejemplo, dichas variantes se pueden usar como inmunosupresor en trasplante, tal como un anti-IL-2R (CD25), que puede inhibir la proliferación de linfocitos T. Dichas variantes también se pueden usar para limitar los procesos inflamatorios (enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, artritis reumatoide), tal como un anticuerpo dirigido contra la cadena α del receptor de IL-6 en el caso de artritis reumatoide. Las variantes de la invención también se pueden usar para inhibir el crecimiento tumoral, tales como anticuerpos anti-EGFR o anticuerpos anti-receptor de HER-2. Las variantes anti-integrinas según la invención también se pueden usar para limitar la formación de trombosis, tal como síndrome coronario agudo, o para tratar psoriasis. En otras realizaciones, las variantes según la invención también se pueden usar para tratar esclerosis múltiple.

50 En consecuencia, las variantes de la invención también se pueden usar como un neutralizante, antagonista o agonista de una molécula diana para tratar o prevenir cáncer, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, o envenenamiento.

55 Por "enfermedades autoinmunes" se incluye aquí rechazo de injerto de islotes alogénico, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, autoanticuerpos citoplásmicos antineutrofilicos (ANCA), enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, neutropenia autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, urticaria autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, celiacía, dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST,

5 enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia del factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de hospedante frente a injerto (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, polineuropatías por IgM, trombocitopenia mediada inmunitariamente, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, panarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, rechazo de trasplante de órgano sólido, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiforme de dermatitis herpetiforme, vitíligo, y granulomatosis de Wegener.

15 Por “trastornos inflamatorios” se incluyen aquí síndrome disneico agudo (ARDS), artritis séptica aguda, artritis adyuvante, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, alergia, asma, aterosclerosis, inflamación crónica debida a infecciones crónicas bacterianas o víricas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), arteriopatía coronaria, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, osteolisis inflamatoria, inflamación asociada con reacciones de hipersensibilidad aguda y retrasada, inflamación asociada con tumores, lesión del nervio periférico o enfermedades desmielinizantes, inflamación asociada con trauma tisular, tales como quemaduras e isquemia, inflamación debida a meningitis, síndrome de lesión multiorgánica, fibrosis pulmonar, septicemia y choque séptico, síndrome de Stevens-Johnson, artropatía no diferenciada, y espondiloartropatía no diferenciada.

20 Por “enfermedades infecciosas” se incluyen aquí enfermedades causadas por patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoos, y parásitos. Las enfermedades infecciosas pueden estar provocadas por virus que incluyen adenovirus, citomegalovirus, dengue, Epstein-Barr, hanta, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), gripe, sarampión, paperas, papovavirus, polio, virus sincitial respiratorio, peste bovina, rinovirus, rotavirus, rubéola, virus del SARS, viruela, meningitis vírica, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden estar causadas por bacterias, incluyendo Bacillus anthracis, Borrelia burgdorferi, Campylobacter jejuni, Chlamydia trachomatis, Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Diphtheria, E. coli, Legionella, Helicobacter pylori, Mycobacterium rickettsia, Mycoplasma nesisseria, Pertussis, Pseudomonas aeruginosa, S. pneumonia, Streptococcus, Staphylococcus, Vibria cholerae, Yersinia pestis, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden estar causadas por hongos, tales como Aspergillus fumigatus, Blastomyces dermatitidis, Candida albicans, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Penicillium marneffeii, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden estar causadas por protozoos y parásitos, tales como clamidia, kokzidioa, leishmania, malaria, rickettsia, tripanosoma, y similares.

35 Además, las variantes de la presente invención se pueden usar para prevenir o tratar afecciones adicionales que incluyen, pero no se limitan a, afecciones cardíacas tales como insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), miocarditis y otras afecciones del miocardio; afecciones de la piel tales como rosácea, acné, y eccema; afecciones óseas y dentales, tales como pérdida de hueso, osteoporosis, enfermedad de Paget, histiocitosis de células de Langerhans, enfermedad periodontal, osteopenia por inactividad, osteomalacia, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa polioestótica, metástasis ósea, manejo del dolor óseo, hipercalcemia maligna humoral, reconstrucción periodontal, lesión de la médula espinal, y fracturas óseas; afecciones metabólicas tales como enfermedad de Gaucher; afecciones endocrinas tales como síndrome de Cushing; y afecciones neurológicas.

40 En una realización de la invención, las variantes anti-RhD según la invención se pueden usar para el tratamiento o la prevención de incompatibilidad rhesus.

45 En otras realizaciones, las variantes anti-CD20 según la invención se pueden usar para el tratamiento de leucemia linfoide.

50 En otras realizaciones, las variantes según la invención se pueden usar para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades autoinmunes tales como púrpura trombocitopénica inmune, púrpura trombocitopénica trombótica, poliartritis reumatoide, y lupus eritematoso.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido progenitor se puede seleccionar de anticuerpos comerciales tales como anticuerpos anti-RhD (véase EMAB2® descrito en el documento FR 0951412 o MonoRho® de ZLB, Zurich) o anti-CD20 (véase el documento WO2006064121)

El polipéptido progenitor también puede ser Avastin® (anti-VEGF), Remicade® (anti-TNF-α), Erbitux® (anti-EGFR), Vectibix® (anti-EGFR), Tysabri® (anti-cadena alfa4 de integrina), Herceptin® (anti-HER2/neu), siendo la lista no limitativa.

En algunas realizaciones, la variante es un anticuerpo neutralizante dirigido contra una molécula diana seleccionada del grupo de receptores de membrana, proteínas humanas solubles, toxinas, proteínas víricas, bacterianas y fúngicas.

5 Debido a su baja unión a C1q y a algunos FcγRs, la variante de la invención es particularmente apropiada para ser usada para el tratamiento de afecciones en las que el reclutamiento del sistema inmune a través de ADCC o CDC no es crucial para la eficiencia terapéutica.

Se anticipa que la administración de la variante polipeptídica de la invención induce menos efecto secundario y menos citotoxicidad mediada por IgG que la mayoría de los anticuerpos e inmunoconjugados que no comprenden 294Del o 293Del en su región Fc.

10 Un objeto adicional de la invención es así el uso de la variante de la invención para prevenir o tratar una patología en la que la inducción de respuestas de ADCC y/o de CDC no es deseable.

15 Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención se refieren a una variante de un polipéptido progenitor para uso en la prevención o tratamiento de una patología en la que no es deseable la inducción de una respuesta de ADCC y/o de CDC, comprendiendo dicha variante una región Fc, que exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprende una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico, con la condición de que dicha variante del polipéptido progenitor no comprenda una modificación de aminoácido que consiste en 294del o 293del combinada con mutaciones en las posiciones tanto 307 como 434, refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU, o equivalente en Kabat.

20 Otras realizaciones se refieren a una variante de un polipéptido progenitor para uso en la prevención o tratamiento de una patología en la que no es deseable la inducción de una respuesta de ADCC y/o de CDC, comprendiendo dicha variante una región Fc, que exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprende una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico, con la condición de que dicha variante del polipéptido progenitor no consista en las variantes 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y.

25 La inducción de respuestas de ADCC y de CDC no es deseable cuando la eficacia terapéutica de la variante no requiera activación de células efectoras o activación de CDC. Tal variante incluye, por ejemplo, anticuerpos bloqueantes o neutralizantes.

Las patologías cuyo tratamiento o prevención no requieren la inducción de CDC y ADCC incluyen, sin estar limitados a ellas, rechazo de injerto, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios, enfermedades infecciosas, o cáncer. Otro objeto de la invención es el uso de una variante de la invención para preparar una composición farmacéutica.

35 En ciertas realizaciones de la invención, las variantes a usar como se describen anteriormente son variantes que exhiben unión reducida a al menos una proteína seleccionada de la proteína C1q y receptores FcγRs en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprenden una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de su progenitor polipeptídico.

40 En realizaciones particulares de la invención, la variante no consiste en las variantes 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y.

En algunas realizaciones, la variante de la invención comprende además al menos una modificación de aminoácido seleccionada de 378V, 434Y, 397M, 302A, 434S, 315D, 230S, 307A, 228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y y la modificación de aminoácido 256N/378V/383N/434Y en la región Fc.

45 En algunas realizaciones específicas, la región Fc de la variante de la invención es una variante de una región Fc de IgG de tipo salvaje que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en 294Del, 293Del, 293Del/294Del, 294Del/256N/378V/383N/434Y, 294Del/259I/315D/434Y, 294Del/397M, 294Del/302A, 294Del/434S, 294Del/315D, 294Del/230S, 294Del/307A, 294Del/228R, 230S/315D/428L/434Y, 294Del/378V y 294Del/434Y de la región Fc, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc es la del índice EU, o equivalente en Kabat.

50 En algunas otras realizaciones, la región Fc de la variante se selecciona del grupo de variantes de regiones Fc de tipo salvaje de IgG que consisten en 294Del, 293Del, 293Del/294Del, 378V/294Del, 434Y/294Del, 294Del/397M, 294Del/302A, 294Del/434S, 294Del/315D, 294Del/230S, 294Del/307A, 294Del/228R, 230S/315D/428L/434Y, 259I/315D/434Y/294Del y 256N/378V/383N/434Y/294Del, en las que la numeración de los aminoácidos se refiere a la numeración de los aminoácidos de Fc del índice EU, o equivalente en Kabat.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden la mencionada variante. Cuando la mencionada variante es un anticuerpo, la variante puede estar presente en forma de anticuerpos monoclonales o policlonales. Las composiciones farmacéuticas se preparan en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando la variante polipeptídica, que tiene el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables.

La composición farmacéutica de la invención se pueden formular según métodos estándar, tales como los descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins; Vigésima primera edición, 2005).

Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar se describen, en particular, en el Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6ª edición revisada, 2009).

A fin de tratar a un paciente que lo necesite, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la variante. Por "dosis terapéuticamente eficaz" se quiere decir aquí una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y será averiguable por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosis pueden oscilar desde 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,1, 1,0, 10, o 50 mg/kg de peso corporal, prefiriéndose 1 a 10 mg/kg. Como es conocido en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de proteínas, el suministro sistémico frente al localizado, y la velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción farmacéutica y la gravedad de la afección, y serán averiguables con experimentación habitual por aquellos expertos en la técnica.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante se hará de muchas maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, parenteralmente, intranasalmente, intraoíticamente, intraocularmente, rectalmente, vaginalmente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo, geles), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente.

Las variantes descritas aquí se pueden administrar concomitantemente con otras sustancias terapéuticas, es decir, las sustancias terapéuticas descritas aquí se pueden coadministrar con otras terapias o sustancias terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, pequeñas moléculas, otras sustancias biológicas, terapia de radiación, cirugía, etc.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos a continuación, sin estar limitada a ellos de ningún modo.

EJEMPLO: Producción de variantes de IgG en base a las variantes Fc, y caracterización de dicha IgG.

I Producción de la variante de IgG en células de mamífero 293-F

I.1 Construcción del vector

El gen Fc humano que codifica los restos de aminoácidos 226-447 (índice de EU, o equivalente en Kabat), es decir, el fragmento Fc (Fc226, SEQ ID nº1), derivado de una cadena pesada de IgG1 humana (Poul MA et al., Eur. J. Immunol. 25(7): 2005-2009 1995), se clonó en el vector de expresión eucariota pMGM05-R603 (Figura 2) como un fragmento *BamHI/NotI* usando protocolos estándar de PCR. El vector pMGM05-R603 deriva de pCEP4 (Invitrogen), y contiene la cadena pesada del anticuerpo quimérico anti-CD20 R603 (LFB-R603). La cadena ligera de este anticuerpo se insertó en un vector similar derivado de pCEP4 (pMGM01-R603). Todas las mutaciones en el fragmento de Fc se insertaron en el vector pMGM05-R603 mediante PCR de solapamiento. Por ejemplo, la variante 294Del se obtuvo usando dos conjuntos de cebadores. Para llevar a cabo la primera PCR, se usaron el cebador de 5' MG_619 5'-AGTACTGACTCTACCTAGGATCCTGCCACCGTGC-3' (SEQ ID Nº10) y el cebador de 3' MG_934 5'-GCTGTTGTACTGCTCCCGCGGCTT-3' (SEQ ID Nº11), y para la segunda PCR, se usaron el cebador de 5' MG_933 5'-AAGCCGCGGGAGCAGTACAACAGC-3' (SEQ ID Nº12) y el cebador de 3' MG_621 5'-ACTGCTCGATGTCCGTAATATGCGGCCGGAATTC-3' (SEQ ID Nº13) (en los que los sitios de restricción *BamHI* y *NotI* están subrayados, y los caracteres en cursiva corresponden a las colas no específicas eliminadas durante la etapa de clonación). Entonces se asoció una fracción de cada fragmento de PCR, y el fragmento alargado resultante se amplificó mediante PCR usando protocolos estándar con los cebadores MG_619 y MG_621. El producto de la PCR se purificó en geles de agarosa al 1% (p/v), se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI*, y se clonó en el vector pMGM05-R603. Como alternativa, se pudo llevar a cabo la mutagénesis con los mismos cebadores (MG_933 y MG_934) usando el Quick-change Multi kit (Stratagene, La Jolla, CA).

I.2 Producción del cultivo celular

Células 293-F FreeStyle™ (Invitrogen) se co-transfectaron con vectores pMGM01-R603 y pMGM05-R603 en cantidades equimolares (250 ng/ml) con el reactivo FreeStyle™ MAX (1 µl/ml) usando protocolos estándar (Invitrogen). Las células se cultivaron en suspensión en medio libre de suero durante 7 días tras la transfección, y los sobrenadantes que contienen IgG se cosecharon tras centrifugar las células a 100g durante 10 minutos. Los

sobrenadantes (1 ml) se titularon entonces (I,3) y se congelaron a -20°C antes de la caracterización de la unión mediante ELISA (III.1.1).

I.3 Titulación de las variantes de IgG producidas

5 Las variantes de IgG segregadas en los sobrenadantes cosechados previamente se cuantificaron usando un ensayo ELISA en la proteína recombinante L (Pierce), con el anticuerpo R603 purificado usado como patrón. Los sobrenadantes y el anticuerpo patrón, diluidos en serie en PBS/0,05% de Tween-20, se ensayaron en inmunoplasmas Maxisorp (Nunc) revestidas previamente con 0,25 µg de proteína L/pocillo y bloqueadas con 5% de leche desnatada en PBS. Tras la incubación durante 1 hora a 37°C, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20. Las
10 variantes de IgG unidas se detectaron con anticuerpo anti-fragmento F(ab')₂ (específico de la cadena γ) de IgG humana de cabra conjugado con HRP (Sigma). Las variantes de IgG producidas se cuantificaron (1-4 µg/ml) usando la curva patrón obtenida con el anticuerpo R603 purificado.

II. Producción de la variante de IgG en células Y2B/O

II.1 Construcción del vector

15 Las variantes Fc 259I/315D/434Y 259I/315D/434Y_294Del, 256N/378V/383N/434Y y 256N/378V/383N/434Y_Del294 se preparan en un formato de IgG con anti-CD20 (R603) o anti-especificidad RhD⁺ (R593) en la estirpe celular YB2/O. A fin de maximizar la productividad en la estirpe celular YB2/O, se neosintetizaron, con optimización de codones para Rattus norvegicus, el ADNc de las cadena pesada y ligera de longitud completa así como el fragmento Fc que codifica las variantes 259I/315D/434Y y 256N/378V/383N/434Y. Se eliminaron las características indeseadas, tales como los sitios de ajuste crípticos o los sitios de restricción.
20 Solamente estaba presente un sitio de restricción (ApaI) en la región de unión variable/constante.

Allí donde se necesitó, la mutación 294Del se introdujo mediante PCR de ensamblaje usando en la PCR1 DELI294P1 (cebador de 5' 5'-CAACGCCAAGACCAAGCCCGGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGG-3', SEQ ID NO 14) + HCH20GA-Ascl (cebador de 3' 5'- AGCGGCGCGCCTCATCA-3', SEQ ID NO 15), que conduce a un amplicón de 501 pb, en la PCR2 DEL294 P2 (cebador de 5' 5' ACCAAGGGCCCAAGCGTGT-3', SEQ ID NO 17) +
25 HCH20GA-Apal (cebador de 3' 5'-CCCTGTAGGTGCTGTTGTACTGCTCCCGGGGCTTGGTCTTGGCGTTG-3', SEQ ID NO 16) que conduce a un amplicón de 541 pb, y finalmente, en la PCR3 HCH20GA-Ascl y HCH20GA-Apal, que conduce a un producto de PCR de 998 pb. El producto de la PCR se digirió con Ascl y ApaI, y el fragmento de 979 pb purificado se insertó en el constructo de expresión en sustitución de la secuencia de ADN parental.

II.2 Producción de cultivo celular

30 Las transfecciones se realizaron en conjuntos estables de YB2/O. Células procedentes de la estirpe celular YB2/O se electroporaron con cada vector de expresión linealizado, después se diluyeron a 25.000 células/ml en medio EMS + 5% v/v de FCS dializado (InvitroGen), y se dispensaron a 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 3 días de recuperación celular, se aplicó presión de selección añadiendo G418, a 2 g/l final, y rojo fenol, 1% final, en medio EMS + 5% de FCS. Después de 10 días de incubación, se obtuvieron 3 conjuntos de 8 pocillos P24, y las células se
35 dividieron, a 2.10⁵ cv/ml en F25. Las producciones de anticuerpo se llevaron a cabo en botellas giratorias en EMS + 5% de FCS con 0,5 g/l de G418 a una concentración de partida entre 2 - 8 10⁵ cv/ml, y se logró una producción celular máxima en 5 días, y el sobrenadante se recogió entonces y se tituló en FastElysa (RD Biotech).

40 Los anticuerpos se purificaron en proteína A Sepahrose type HiTrap protein A FF (GE-Healthcare), se eluyeron entonces en amortiguador de citrato de sodio 25 mM, pH 3,0, y las fracciones se neutralizaron, se dializaron en PBS, pH 6,0, toda la noche a 4°C.

45 Las IgGs purificadas se caracterizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, así como con filtración en gel, a fin de estimar los contenidos de agregados. Cualquiera que sea la mutación, las IgGs se purificaron hasta más de 85%, y muy a menudo hasta más de 95%, y presentaron las bandas características de cadena pesada y ligera para cada IgG. Adicionalmente se usó el método Gel Clot del ensayo de endotoxinas de LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus), para estudiar las IgGs purificadas en busca de la presencia de endotoxinas. Los bajos niveles de endotoxina, así como el bajo contenido de agregados, demuestran que los anticuerpos producidos son por lo tanto compatibles para el ensayo funcional.

III. Caracterización de la unión de las variantes de IgG mediante ELISA

III.1 Materiales y métodos

50 III.1.1 Ensayos ELISA para variantes de IgG producidas en los sobrenadantes de células 293-F

Las variantes de IgG se ensayaron mediante ELISA para determinar su unión a varios receptores: complemento C1q (Calbiochem), FcγRIIIaV158 (R&D system), FcRn-p3 (FcRn-p3 se refiere a una proteína de fusión que comprende la cadena de β2 microinmunoglobulina y la cadena α fusionada a la proteína p3 de bacteriófago y la proteína CVDE, y se produce en un sistema baculovírico como se describe en Popov et al., Mol. Immunol., 1996, 33:521-530),

FcγRIIIaR131 (R&D system), FcγRI (R&D system) y FcγRIIb (R&D system). Los ensayos ELISA se llevaron a cabo en PBS para todos los receptores, excepto para FcRn, que se realizó en P6 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 6,0) puesto que la unión FcRn/IgG depende del pH y el óptimo está en pH 6,0. Las inmunoplasmas Maxisorp se revistieron con 0,5 µg de complemento C1q/pocillo en PBS, 0,25 µg de FcγRIIIaV158/pocillo en PBS o 0,1 µg de FcγRI/pocillo en PBS o 0,1 µg de FcRn-p3/pocillo en P6. Placas de quelato de níquel Immobilizer (Nunc) se revistieron con 0,1 µg de FcγRIIIaR131/pocillo o 0,4 µg de FcγRIIb/pocillo en KCl 0,01M. Tras el revestimiento durante toda la noche a 4°C, las placas se lavaron 2 veces con PBS/0,05% de Tween-20 (o P6/0,05% de Tween-20 para FcRn), y se saturaron con PBS/4% de BSA (o P6/4% de BSA para FcRn) durante 2 horas a 37°C. En paralelo, los sobrenadantes se diluyeron en PBS a una concentración final de IgG de 0,5 µg/ml (o se diluyeron en P6 a 0,3 µg/ml para el ensayo de unión a FcRn), y se mezclaron con anti-F(ab')₂ humano de cabra F(ab')₂ conjugado con HRP, a la misma concentración durante 2 horas a temperatura ambiente. Las IgGs agregadas con F(ab')₂ se incubaron entonces con agitación suave durante 1 hora en las placas de ELISA saturadas, sin dilución para C1q, FcγRIIIaR131 y FcγRIIb (es decir, IgGs a 0,5 µg/ml), diluidas en PBS a 0,25 µg/ml para FcγRIIIaV158 y FcγRI, o diluidas en P6 a 0,0375 µg/ml para FcRn-p3. Las placas se revelaron entonces con TMB (Pierce), y se leyó la absorbancia a 450 nm.

III.1.2 Ensayos ELISA de variantes de IgG purificadas

Las variantes de IgG producidas en Y2B/0 se ensayaron mediante ELISA para determinar su unión a varios receptores: FcRn-p3 (como en II.1.1), FcγRI (R&D system), FcγRIIIaV158 (R&D system), FcγRIIIaF158 (producido transitoriamente mediante PX Therapeutics en células HEK293F como proteína etiquetada con His), FcγRIIIaR131 (R&D system), FcγRIIIaH131 (producido transitoriamente mediante PX Therapeutics en células HEK293F como proteína etiquetada con His) and FcγRIIb (R&D system). Los ensayos ELISA se llevaron a cabo en PBS para todos los receptores excepto para FcRn, que se realizó en P6 (fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 6,0). Inmunoplasmas Maxisorp (Nunc) se revistieron con 100 ng de proteína recombinante/pocillo en PBS para FcγRI, FcγRIIIaV158, FcγRIIIaF158 y FcγRIIIaH131, o 200 ng de FcRn-p3/pocillo en P6. Placas de quelato de níquel Immobilizer (Nunc) se revistieron con 100 ng de FcγRIIIaR131/pocillo o 400 ng de FcγRIIb/pocillo en KCl 0,01 M. Tras el revestimiento durante toda la noche a 4°C, las placas se lavaron 2 veces con PBS/0,05% de Tween-20 (o P6/0,05% de Tween-20 para FcRn), y se saturaron con PBS/4% de BSA (o PBS/4% de leche desnatada para FcγRI, o P6/4% de leche desnatada para FcRn) durante 2 horas a 37°C.

Para los ensayos de unión a FcγRIIIaV158, FcγRIIIaF158, FcγRIIIaR131, FcγRIIIaH131 y FcγRIIb, las IgGs purificadas se diluyeron en PBS a una concentración final de 2-4 µg/ml, y se mezclaron con anti-F(ab')₂ humano de cabra F(ab')₂ conjugado con HRP, a la misma concentración durante 2 horas a temperatura ambiente. Las IgGs agregadas con F(ab')₂ se incubaron entonces con agitación suave durante 1 hora a 30°C en las placas de ELISA saturadas, tras la dilución en serie en PBS. Las placas se revelaron entonces con TMB (Pierce), y la absorbancia se leyó a 450 nm. Para FcγRI y FcRn, se llevó a cabo un ELISA directo. Las IgGs purificadas se diluyeron en PBS (o P6 para FcRn) suplementado con 4% de leche desnatada y 0,01% de Tween 20, y se incubaron en placas durante 2 horas. Los anticuerpos unidos se detectaron entonces con anti-F(ab')₂ humano de cabra F(ab')₂ conjugado con HRP (1/2500), diluido en el mismo amortiguador. Después de 2 horas de incubación a 37°C, las placas se revelaron con TMB (Pierce), y la absorbancia se leyó a 450 nm.

III.2 Resultados

III.2.1 IgG producida en sobrenadantes de células 293-F

Para cada variante de IgG, se llevaron a cabo dos experimentos independientes (producción, titulación del sobrenadante y ELISA en los 5 receptores). Los resultados del ELISA se expresaron como una relación de señal específica (OD_{450nm}) obtenida para la variante de IgG, comparada con la señal de la IgG-WT. Estos ensayos ELISA mostraron que la mutación 294Del altera drásticamente la capacidad de las variantes para unirse a C1q (relación/IgG-WT < 0,50) y a los FcγRs (relación/IgG-WT < 0,25), en comparación con sus polipéptidos progenitores respectivos. Por el contrario, la mencionada mutación solo da como resultado alrededor de 0-35% de pérdida de unión a FcRn para las variantes que combinan la 294Del con al menos otra mutación. Los resultados se presentan aquí más abajo en las Tablas 1 y 2.

50

Tabla 1.: Relación de la señal específica de variantes de IgG1 con la señal específica obtenida para IgG1 de tipo salvaje en ensayos ELISA para las proteínas diana C1q, FcγRIIIaR131, FcγRIIb, FcγRIIIaV158, FcγRI y FcRn.

Mutaciones	C1q		FcγRI		FcγRIIIaR131		FcγRIIb		FcγRIIIaV158		FcRn	
	Relación/IgG-Wt	SD										
294Del	0,10	0,10	0,37	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,44	0,02
259I/315D/434Y	1,26	0,08	0,82	0,08	1,23	0,01	1,07	0,32	1,08	0,04	4,32	1,02
259I/294Del/315D/434Y	0,13	0,10	0,34	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	2,87	0,33
256N/378V/383N/434Y	3,65	0,63	0,93	0,2	2,59	0,44	4,77	1,17	2,09	0,51	4,63	1,15
256N/294Del/378V/383N/434Y	0,14	0,04	0,61	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	3,47	0,31
307A	2,24	0,51	1,20	0,11	1,8	0,01	1,47	0,49	1,14	0,19	1,99	0,45
294DEL/307A	0,46	0,00	0,35	0,02	0,01	0,00	0,20	0,00	0,01	0,00	1,94	0,54
228R	0,80	0,09	0,92	0,19	1,02	0,06	1,59	0,03	1,03	0,23	1,11	0,29
228F/294DEL	0,45	0,09	0,42	0,07	0,01	0,01	0,03	0,03	0,01	0,01	1,38	0,33
230S	0,72	0,13	0,95	0,26	0,73	0,25	0,92	0,26	0,79	0,01	1,21	0,41
230S/294DEL	0,46	0,09	0,40	0,14	0,01	0,01	0,05	0,03	0,01	0,00	1,28	0,37
230S/315D/428L/434Y	1,12	0,29	0,91	0,16	1,45	0,34	1,17	0,07	0,40	0,10	3,94	0,91
230S/294DEL/315D/428L/434Y	0,35	0,04	0,25	0,05	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	3,86	0,62
315D	0,95	0,28	0,71	0,24	0,77	0,34	1,02	0,56	1,25	0,15	1,09	0,21
294DEL/315D	0,29	0,14	0,40	0,09	0,01	0,00	0,21	0,07	0,01	0,01	1,16	0,19
378V	1,71	0,37	1,12	0,34	3,37	0,68	8,00	1,17	2,88	0,24	1,82	0,14
294DEL/378V	0,37	0,08	0,33	0,03	0,06	0,01	0,11	0,11	0,01	0,00	1,46	0,09
434S	0,85	0,12	0,94	0,11	0,95	0,15	1,56	0,32	1,22	0,08	2,68	0,49
294DEL/434S	0,25	0,25	0,49	0,02	0,02	0,02	0,05	0,05	0,01	0,00	2,64	0,60

Mutaciones	C1q		FcγRI		FcγRIIIaR131		FcγRIIIb		FcγRIIIaV158		FcRn	
	Relación/IgG- Wt	SD										
302A	0,88	0,22	0,96	0,33	2,01	0,00	3,45	0,00	0,55	0,14	0,91	0,35
294DEL/302A	0,21	0,07	0,06	0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,01	0,00	0,66	0,06
397M	3,70	0,79	1,69	0,34	3,77	0,19	3,12	1,28	1,87	0,16	1,01	0,14
294DEL/397M	0,25	0,25	0,68	0,23	0,03	0,02	0,04	0,04	0,01	0,01	0,84	0,13
434Y	1,84	0,59	0,70	0,36	1,51	0,34	1,24	0,22	0,80	0,26	2,53	0,70
294DEL/434Y	0,45	0,20	0,32	0,12	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01	0,00	3,37	0,35

Tabla 2: Impacto de 294Del sobre la unión de las variantes de IgG1 a FcγR, C1q y receptores FcRn: las relaciones obtenidas dividiendo la señal específica para la variante obtenida mediante la introducción de 294Del entre aquella de la IgG1 correspondiente que no comprende 294Del se muestran en la tabla aquí a continuación para cada proteína de interés.

Mutaciones	C1q	FcγRI	FcγRIIIaR131	FcγRIIb	FcγRIIIaV158	FcRn
294Del	0,10	0,37	0,01	0,01	0,01	0,44
259I/294Del/315D/434Y	0,10	0,41	0,01	0,01	0,02	0,66
256N/294Del/378V/383N/434Y	0,04	0,66	0,004	0,002	0,01	0,75
294DEL/307A	0,21	0,29	0,08	0,14	0,009	0,97
228R/294DEL	0,56	0,46	0,01	0,02	0,01	1,24
230S/294DEL	0,64	0,42	0,01	0,05	0,01	1,06
230S/294DEL/315D/428L/434Y	0,31	0,27	0,007	0,02	0,03	0,98
294DEL/315D	0,31	0,56	0,01	0,21	0,008	1,06
294DEL/378V	0,22	0,29	0,02	0,01	0,003	0,80
294DEL/434S	0,29	0,52	0,02	0,03	0,008	0,99
294DEL/302A	0,24	0,06	0,01	0,02	0,02	0,73
294DEL/397M	0,07	0,40	0,008	0,01	0,005	0,83
294DEL/434Y	0,24	0,46	0,02	0,02	0,01	1,33

5

III.2.2 Resultados de ELISA en IgGs purificadas

Los resultados del ELISA se expresaron como una relación de la señal específica (OD450nm), obtenida para las variantes de IgG purificadas obtenidas a partir de células Y2B/0, comparada con la señal de la IgG-WT (R603, anticuerpo quimérico anti-CD20, y R593, anticuerpo humano anti-RhD⁺) a una única concentración de anticuerpo (0,5 μg/ml para FcγRIa y FcγRIIIaV158, 1 μg/ml para FcγRIIIaF158, FcγRIIIaR131 y FcγRIIIaH131, 2 μg/ml para FcγRIIb y 5 μg/ml para FcRn). Estos ensayos de ELISA mostraron que la mutación 294Del no modifica significativamente la unión de las variantes a FcRn en comparación con la IgG de tipo salvaje correspondiente. Cuando se compara con las IgGs variantes que comprenden los polipéptidos progenitores respectivos (R603 o R593 259I/315D/434Y y R603 o R593 256N/378V/383N/434Y), la mencionada mutación solamente da como resultado alrededor de 0-30% de pérdida de unión a FcRn para las variantes 259I/294Del/315D/434Y y 256N/294Del/378V/383N/434Y (Tabla 4). Por el contrario, la mutación 294Del altera drásticamente la capacidad de las variantes para unirse a los FcγRs en comparación con sus polipéptidos progenitores respectivos.

10

15

Tabla 3: Relación de la señal específica de variantes de IgG1 con la señal específica obtenida para IgG1 de tipo salvaje en ensayos ELISA para las proteínas diana FcγRIa, FcγRIIIaV158, FcγRIIIaF158, FcγRIIIaR131, FcγRIIIaH131, FcγRIIb y FcRn.

20

Variante	FcγRI	FcγRIIIaV158	FcγRIIIaF158	FcγRIIIaR131	FcγRIIIaH131	FcγRIIb	FcRn
R603-294Del	0,15	0,07	0,09	0,07	0,10	0,42	0,71
R603-256N/378V/383N/434Y	2,19	1,22	1,25	1,40	0,93	1,83	8,51
R603-256N/294Del/378V/383N/434Y	0,15	0,07	0,08	0,08	0,08	0,46	8,89
R603-259I/315D/434Y	1,12	1,11	1,11	1,11	0,99	1,54	6,93
R603-259I/294Del/315D/434Y	0,10	0,05	0,08	0,07	0,08	0,41	5,97
R593-294Del	0,08	0,07	0,06	0,10	0,10	0,18	0,91
R593-256N/378V/383N/434Y	2,19	0,98	0,92	1,08	1,01	1,55	7,49

Variante	FcgRI	FcgRIIIaV158	FcgRIIIaF158	FcgRIIIaR131	FcgRIIIaH131	FcgRIIb	FcRn
R593-256N/294Del/378V/383N/434Y	0,12	0,10	0,10	0,17	0,17	0,27	7,48
R593-259I/315D/434Y	1,08	0,95	0,94	1,05	0,94	1,41	7,93
R593-259I/294Del/315D/434Y	0,13	0,07	0,07	0,12	0,10	0,18	7,19

Tabla 4: Impacto de 294Del sobre la unión de las variantes de IgG1 a Fc γ Rs y a FcRn: las relaciones se calcularon dividiendo la señal específica para la variante obtenida mediante la introducción de 294Del entre aquella de la IgG1 correspondiente que no comprende 294Del.

Variante	FcgRI	FcgRIIIaV158	FcgRIIIaF158	FcgRIIIaR131	FcgRIIIaH131	FcgRIIb	FcRn
R603-294Del	0,15	0,07	0,09	0,07	0,10	0,42	0,71
R603-256N/294Del/378V/383N/434Y	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09	0,25	1,04
R603-259I/294Del/315D/434Y	0,09	0,05	0,07	0,06	0,08	0,27	0,86
R593-294Del	0,08	0,07	0,06	0,10	0,10	0,18	0,91
R593-256N/294Del/378V/383N/434Y	0,05	0,10	0,11	0,16	0,17	0,17	1,00
R593-259I/294Del/315D/434Y	0,12	0,07	0,07	0,11	0,11	0,13	0,91

5

IV Caracterización de la unión mediante ensayos de SPR (Resonancia de Plasmones Superficiales)

IV.1 Materiales y métodos

La interacción de las variantes de IgG (véase II.2) con FcRn inmovilizado se monitorizó en un instrumento BIAcore X100 usando un chip sensor CM5 (Biacore, GE Healthcare). La metodología fue similar a la descrita previamente para analizar las interacciones Fc-FcRn (Popov S. et al., Mol Immunol. 33(6):521-530 (1996)). Se acopló FcRn soluble recombinante a la celda 2 de flujo del chip sensor usando química de acoplamiento amínico. Las celdas de flujo se activaron durante 3 min. con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M, a un caudal de 30 μ l/min. FcRn humano recombinante (5 μ g/ml en acetato sódico 10 mM, pH 5,0) se inyectó sobre la celda 2 de flujo durante 3 min. a 10 μ l/min., lo que dio como resultado una densidad de superficie de 236 unidades de respuesta (RU). Las superficies se bloquearon con una inyección durante 3 min., a 30 μ l/min., de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5. La celda 1 de flujo se usó como una superficie de control sin FcRn, y se preparó de forma similar a la celda de flujo de la muestra. Los datos de esta celda de flujo en blanco se restaron de los datos de la muestra.

Se diluyeron variantes de IgG en PBS/Tween-20 (amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM, 0,02% de NaN₃, 0,05% de Tween-20), que se usó como amortiguador de recorrido en experimentos de unión en el equilibrio. Todas las medidas se llevaron a cabo a 25°C, con concentraciones del fragmento Fc típicamente de 0, 8,75, 35, 70 y 200 nM a un caudal de 10 μ l/min.

Los datos se recogieron durante 8 min., y se usó un pulso de 30 s de PBS, pH 7,5, que contiene 0,05% de Tween-20, para regenerar las superficies.

Se generaron sensogramas, y se analizaron usando el software BIAevaluation versión 3.1. La RU en el equilibrio observada para cada inyección se representó gráficamente frente a la concentración de Fc. Los valores KD en el equilibrio se derivaron mediante análisis de las gráficas usando el modelo de afinidad cinética incluido en el software BIA evaluation.

IV.2 Resultados

La afinidad de unión (valores de KD) de los anticuerpos R593 y R603 fueron 190 y 99 nM respectivamente. En comparación, en el contexto de R603, los valores de KD de 259V/315D/, y en el contexto de R603 fue 26 nM para 259V/315D/434Y, que ilustra una mayor afinidad por FcRn entre 3 a 6 veces a pH 6,0. Los valores de KD de 259V/294Del/315D/434Y fueron 28 nM y 20 nM para R593 y R603 respectivamente, que muestran que la 294Del no modifica significativamente la afinidad por FcRn en comparación con la variante del polipéptido progenitor respectiva.

35

Tabla 5: Impacto de Del294 sobre la afinidad de unión (valores de KD) entre variantes de IgG1 anti-RhD⁺ (R593) o anti-CD20 (R603) y FcRn. Las relaciones se calcularon dividiendo la KD para con la de la variante correspondiente obtenida mediante la introducción de 294Del con la del correspondiente.

	KD (M)	Relación WT/IgG
R603	9,90E-08	1,00
R603 294Del	1,9E-07	0,52
R603-259I/315D/434Y	2,69E-08	3,68
R603-259I/294Del/315D/434Y	2,80E-08	3,54
R593	1,9E-07	1,00
R593-Del294	2,04E-07	0,93
R593-256N/378A/383N/434Y	4,20E-08	4,52
R593-256N/294Del/378A/383N/434Y	4,23E-09	44,92
R593-259I/315D/434Y	2,04E-08	9,31
R593-259I/294Del/315D/434Y	2,02E-08	9,41

5 V Caracterización funcional

IV.1 Materiales y métodos

IV.1.1 Unión a antígeno

Se incubaron 2 x 10⁵ células (glóbulos rojos RhD⁺ o Raji) con 100 µl de anticuerpo a diferentes concentraciones (0 a 100 µl/ml, concentración final) a 4°C durante 30 minutos.

- 10 Tras el lavado, los mAbs se visualizaron con un anticuerpo anti-Fc gamma humano de cabra acoplado a ficoeritrina (100 µl de una dilución de 1:100) a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron y se estudiaron con un citómetro de flujo (FC500, Beckman Coulter).

IV.1.2 Ensayo de ADCC anti-RhD⁺

- 15 Se prepararon linfocitos a partir de una fracción de células mononucleares obtenida a partir de 3 capas leucocitarias individuales mediante centrifugación mediante un gradiente de densidades sobre Ficoll. Pack Plus (Pharmacia). Las plaquetas se eliminaron mediante centrifugación (190 g, 15 min.), y las células residuales se lisaron en NH₄Cl. Los monocitos se agotaron mediante dos adherencias sucesivas (2 X 30 min.) a matraces de cultivo tisular de plástico a 37°C en IMDM/FCS25%. El porcentaje final de monocitos debería ser menor que 15% del recuento de células totales. Los linfocitos no adherentes se lavaron antes de resuspenderlos, a 8 x 10⁷ células/ml, en IMDM.
- 20 Los glóbulos rojos procedentes de concentrado terapéutico (grupo O, Rhesus +) se trataron durante 10 min. con papaína (1 mg/ml), después se lavaron tres veces con disolución salina antes de resuspenderlos, a 4 x 10⁷ células/ml, en IMDM. Se diluyó disolución de inmunoglobulina humana procedente de therapeutic IV Ig (Tégéline, LFB) a 2 y 10 mg/ml en IMDM. El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC). Los sobrenadantes de cultivo o los anticuerpos anti-D purificados (100 µl a 200 ng/ml en IMDM que contiene 0,5% de FCS), las células efectoras (25 µl), los glóbulos rojos (25 µl) y la inmunoglobulina humana (50 µl) se incubaron durante 16 h a 37°C en una atmósfera humidificada, enriquecida en % de CO₂. Para cada muestra ensayada, se incluyó la liberación no específica, que consiste en IMDM en lugar de la suspensión de las células efectoras. Tras centrifugar las placas, se recogieron 60 µl de sobrenadante por pocillo, después se mezclaron con 60 µl de 2,7-diaminofluoreno (DAF, Sigma). Tras 5 min., la OD se midió a 620 nm. El porcentaje de lisis se estimó usando una curva de calibración reconstituida con diversas diluciones de glóbulos rojos lisados (NH₄Cl), que corresponden a 100, 75, 50, 25 y 0% de lisis respectivamente.
- 30

IV.1.3 Ensayo de ADCC anti-CD20

- 35 Se prepararon linfocitos a partir de una fracción de células mononucleares obtenida de 1 capa leucocitaria individual mediante centrifugación por gradiente de densidades sobre Ficoll Pack Plus (Pharmacia). Las plaquetas se eliminaron mediante centrifugación (190 g, 15 min.), y los glóbulos rojos residuales se lisaron en NH₄Cl. Las células NK se purificaron usando un kit de aislamiento de selección negativa (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

Las células purificadas tenían al menos 90% CD56+. Menos de 3% de las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD14, anti-CD3 o anti-CD19 conjugados con PE. El polimorfismo de FcγRIIIA se determinó como se describió previamente (Dall'Ozzo et al, 2003). Células B linfoblastoides Raji (dianas) se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 10% de FCS, 2 mmoles/l de L-glutamina, y 1 mmol/l de piruvato sódico (medio completo). Las células diana se mezclaron con células NK, a una relación de efectoras/diana (E/T) de 15/1, en presencia de anticuerpo monoclonal (intervalo, 500-5 ng/ml). La liberación de LDH en los sobrenadantes se midió mediante fluorimetría (Kit de Detección de Citotoxicidad de Roche Applied Sciences, ref. 11644793001) usando un espectrofluorímetro de microplacas (Tecan, Mannedorf-Zurich, Suiza). Los datos se expresaron como densidad óptica o unidades fluorescentes arbitrarias (AFU), y el porcentaje de lisis se calculó según la siguiente fórmula: % de lisis = 100 x (ER - SR) / (MR - SR), en la que ER, SR, y MR representan, respectivamente, la liberación experimental, espontánea, y máxima. Los valores de ADCC se expresaron como: % de ADCC = (% de lisis en presencia de mAb) - (% de lisis sin mAb).

IV.1.4 Ensayo de CDC

Estirpes celulares diana ASC-1 se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-AMHRII (0 a 2500 ng/ml) en presencia de suero de cría de conejo como fuente de complemento (dilución hasta 1/10). Tras 1 hora de incubación a 37°C, la cantidad de LDH liberada en el sobrenadante por las células diana lisadas se midió mediante fluorimetría (Kit de Detección de Citotoxicidad de Roche Applied Sciences, ref. 11644793001), y se usó para calcular el porcentaje de citotoxicidad dependiente del complemento mediada por los diferentes anticuerpos. El porcentaje de lisis se calculó según la siguiente fórmula: % de lisis = ER - SA, en la que ER es la respuesta experimental y SA es la actividad espontánea obtenida cuando la célula diana se incubaba en presencia de complemento, sin anticuerpo. Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis como una función de la concentración del anticuerpo. Emax (porcentaje de lisis máxima) y EC50 (cantidad de anticuerpo que induce 50% de lisis máxima) se calcularon usando el software PRISM.

IV.2 Resultados

El ensayo de reconocimiento de antígeno muestra que la introducción de la mutación Del294, ya sea en IgG1 anti-RhD+ wt o progenitor variante no afecta a las propiedades de unión al antígeno de las variantes de IgG1 obtenidas. De hecho, todas las variantes de IgGs anti-RhD+ (R593) se unen a RBCs (glóbulos rojos) RhD+, como se ilustra en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Unión de IgG1 anti-RhD+ wt (R593) y variantes a RBCs que expresan el antígeno RhD+.

	Unión al Ag
Variantes de IgG1 anti-RhD+	MFI (Unidad arbitraria)
T256N/A378V/S383N/N434Y	49,6
V259I/N315D/N434Y	47,2
E294Del	52,6
E294Del/T256N/A378V/S383N/N434Y	44,7
E294Del/V259I/N315D/N434Y	47,9
R593	31,7

Adicionalmente, consistente con la afinidad muy baja de las variantes 259I/294Del/315D/434Y y 256N/294Del/378V/383N/434Y y 294Del por los receptores Fcγ, dichas variantes no presentan actividad de ADCC en comparación con R593 o con las IgGs variantes progenitoras, como se ilustra en la tabla 7

Tabla 7: Variantes 294Del anti-RhD+ no presentan actividad de ADCC. Concentración eficaz semimáxima que induce 50% de lisis de células diana (Ec50, ng/ml), y porcentaje de lisis máxima de células diana en presencia de anti-CD20 variantes y wt, según se estima en IV.1.2.

Variantes de IgG1 anti-RhD+	ADCC	
	EC50 (ng/ml)	Lisis máx. (%)
T256N/A378V/S383N/N434Y	11,06	93
V259I/N315D/N434Y	14,17	89

Variantes de IgG1 anti-RhD+	ADCC	
	EC50 (ng/ml)	Lisis máx. (%)
E294Del	75,86	5
E294Del/T256N/A378V/S383N/N434Y	75,86	6
E294Del/V259I/N315D/N434Y	75,86	4
R593	11,06	93

Se ha mostrado además (véase la tabla 8 más abajo) que la introducción de la mutación Del294 no afecta a la unión de una IgG1 wt anti-CD20 (R603) o de una variante de IgG1 anti-CD20 (R603) V259I/N315D/N434Y para el antígeno CD20.

5 Tabla 8: Unión de IgG1 anti-CD20 wt (R603) y de variantes de IgG R603_259I/315D/434Y, R603_259I/294Del/315D/434Y y R603_294Del a células B linfoblastoides Raji que expresan el antígeno CD20.

Variantes de IgG1 anti-CD20	Unión al Ag
Variantes de IgG1 anti-CD20	MFI (Unidad arbitraria)
Fcwt	123
V259I/N315D/N434Y	137
E294Del	126
E294Del/V259I/N315D/N434Y	96

10 Como se esperaba en vista de la afinidad muy baja de la variante de IgG R603_259I/294Del/315D/434Y y R603_294Del tanto por la proteína C1q como por los receptores Fc γ , las mencionadas variantes no presentan actividad de ADCC ni de CDC en comparación con las R603 o IgGs variantes progenitoras, como se ilustra en las tablas 9 y 10 a continuación.

Tabla 9: Las variantes 294Del anti-CD20 no presentan actividad de ADCC. Concentración eficaz semimáxima que induce 50% de lisis de células diana (EC50, ng/ml), y porcentaje de lisis máxima de células diana en presencia de variantes anti-CD20 y wt, según se estima en IV.1.3.

Variantes de IgG1 anti-CD20	CDC	
	EC50 (ng/ml)	Lisis máx. (%)
Fcwt	464	45
V259I/N315D/N434Y	410	40
E294Del	NA	2
E294Del/V259I/N315D/N434Y	NA	1

15 Tabla 10: Las variantes 294Del anti-CD20 no presentan actividad de CDC. Concentración eficaz semimáxima que induce 50% de lisis de células diana (EC50, ng/ml) en presencia de anti-CD20 variantes y wt, según se estima en IV.1.4.

Variantes de IgG1 anti-CD20	CDC
	EC50 (ng/ml)
Fcwt	464

	CDC
Variantes de IgG1 anti-CD20	EC50 (ng/ml)
V259I/N315D/N434Y	410
E294Del	NA
E294Del/V259I/N315D/N434Y	NA

Tabla 11: Secuencias citadas en el listado de secuencias

SEQ ID NO:	Secuencias
1	Fc de IgG1 humana (restos 226-447 según el índice EU o equivalente en Kabat)
2	Fc de IgG2 humana
3	Fc de IgG3 humana
4	Fc de IgG4 humana
5	Fragmento de la cadena pesada del alotipo G1m1,17 de IgG1 humana (mostrado en la Figura 1)
6	Fragmento de la cadena pesada del alotipo G1m3 de IgG1 humana (mostrado en la Figura 1)
7	Fragmento de la cadena pesada de IgG2 humana (mostrado en la Figura 1)
8	Fragmento de la cadena pesada de IgG3 humana (mostrado en la Figura 1)
9	Fragmento de la cadena pesada de IgG4 humana (mostrado en la Figura 1)
10	Cebador de 5'
11	Cebador de 3'
12	Cebador de 5'
13	Cebador de 3'
14	Cebador de 5'
15	Cebador de 3'
16	Cebador de 3'
17	Cebador de 5'

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> LFB Biotechnologies
 Millegen
 <120> Variantes Fc con funciones efectoras reducidas
 <130> X822EP
 <160> 13
- 10 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 < 211> 222
 < 212> PRT

ES 2 755 708 T3

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

< 222> (131)..(131)

5 < 223> Para alotipo Glm1,17, x es D

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

< 222> (131)..(131)

< 223> Para alotipo Glm3, x es E

10 <220>

< 221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

< 222> (133)..(133)

< 223> Para alotipo Glm1,17, x es L

<220>

15 < 221> CARACTERÍSTICA DIVERSA

< 222> (133)..(133)

< 223> Para alotipo Glm3, x es M

<400> 1

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

20

ES 2 755 708 T3

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 2

< 211> 221

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 85 90 95

ES 2 755 708 T3

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 100 105 110

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 180 185 190

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 3

< 211> 222

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

ES 2 755 708 T3

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 4

< 211> 221

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Pro Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 65 70 75 80

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 85 90 95

ES 2 755 708 T3

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215 220

<210> 5

< 211> 232

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

ES 2 755 708 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 6

< 211> 232

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

ES 2 755 708 T3

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 7

< 211> 228

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

ES 2 755 708 T3

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 8

< 211> 279

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

ES 2 755 708 T3

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn
210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
245 250 255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275

<210> 9

< 211> 228

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 755 708 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu
 50 55 60
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

Ser Leu Gly Lys

225

<210> 10

5 <211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 755 708 T3

< 223> Cebador de 5'
<400> 10
agtactgact ctacctagga tcctgcccac cgtgc 35
<210> 11
5 < 211> 24
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador de 3'
10 <400> 11
gctgtgtac tgctcccgcg gctt 24
<210> 12
< 211> 24
< 212> ADN
15 < 213> Artificial
<220>
< 223> Cebador de 5'
<400> 12
aagccgcggg agcagtacaa cagc 24
20 <210> 13
< 211> 35
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
25 < 223> Cebador de 3'
<400> 13
actgctcgat gtccgtacta tgcgcccgcg aattc 35
1

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una variante de un polipéptido progenitor que comprende una región Fc de SEQ ID NO:1, variante la cual exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, en la que se introduce una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (i) 294Del, en la que dicha modificación de aminoácido 294Del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor,
- (ii) 293Del, y
- (iii) 293Del/294Del,
- 10 en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU o equivalente en Kabat.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la modificación de aminoácido 293Del es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la modificación de aminoácido del293/del294 es la única modificación de aminoácido introducida en la región Fc del polipéptido progenitor.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la región Fc del polipéptido progenitor es una variante de una región Fc de IgG de tipo salvaje que comprende una modificación de aminoácido seleccionada de 434Y, 378V, 259I/315D/434Y y 256N/378V/383N/434Y.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la variante se selecciona del grupo que consiste en Fc aislados, proteínas de fusión con Fc, conjugados con Fc y anticuerpos.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de introducir la mencionada modificación de aminoácido en la región Fc del polipéptido progenitor comprende:
- (i) proporcionar un ácido nucleico que codifica el polipéptido progenitor,
- (ii) modificar el ácido nucleico proporcionado en la etapa (i) para obtener un ácido nucleico que codifica la mencionada variante, y
- 25 (iii) expresar el ácido nucleico obtenido en la etapa (ii) en una célula hospedante y recuperar la mencionada variante.
7. Una variante de un polipéptido progenitor, que comprende una región Fc de SEQ ID NO:1, y que exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR escogido de FcγRII y FcγRIII en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y en la que se introduce una modificación de aminoácido que consiste en 293del/294del en la región Fc del polipéptido progenitor, refiriéndose la numeración de los aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU, o equivalente en Kabat.
- 30 8. La variante según la reivindicación 7, en la que la variante es un anticuerpo neutralizante dirigido contra una molécula diana seleccionada del grupo de receptores de membrana, proteínas humanas solubles, toxinas, proteínas víricas, bacterianas y fúngicas.
- 35 9. Un ácido nucleico aislado que codifica una variante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula hospedante que contiene el vector de la reivindicación 10.
12. Una variante de un polipéptido progenitor para uso en la prevención o tratamiento de una patología en la que no es deseable la inducción de una respuesta de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), comprendiendo dicha variante una región Fc, que exhibe unión reducida a la proteína C1q y a al menos un receptor FcγR en comparación con el mencionado polipéptido progenitor, y que comprende una modificación de aminoácido seleccionada de 294Del, 293Del y 293Del/294Del en su región Fc, en comparación con la región Fc de SEQ ID NO:1 de su progenitor polipeptídico, con la condición de que dicha variante del polipéptido progenitor no consista en las variantes 294Del/T307P/N434Y o 293Del/T307P/N434Y, refiriéndose la numeración de aminoácidos en la región Fc a la numeración según el índice EU, o equivalente en Kabat.
- 40 13. Una composición farmacéutica que comprende una variante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 45 50

226

Igg1m(1, 17) EPKCDK--THT-----CPCCPAPEL
 Igg1m(3) EPKCDK--THT-----CPCCPAPEL
 Igg2, ERKCCVE-----CPCCPAPPV
 Igg3 ELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEL
 Igg4 ESKYG-----PPCPS-PAPEF

 Igg1m(1, 17) LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 Igg1m(3) LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 Igg2 -AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 Igg3 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTF
 Igg4 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTF

 Igg1m(1, 17) RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT
 Igg1m(3) RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT
 Igg2 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT
 Igg3 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLT
 Igg4 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLT

 Iggm(1, 17) CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL
 Igg1m(3) CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEGL
 Igg2 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL
 Igg3 CLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFVCSVMHEAL
 Igg4 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL

 Igg1m(1, 17) HNHYTQKSLSLSPGK
 Igg1m(3) HNHYTQKSLSLSPGK
 Igg2, HNHYTQKSLSLSPGK
 Igg3 HNRFTQKSLSLSPGK
 Igg4 HNHYTQKSLSLSLGK

Figura 1

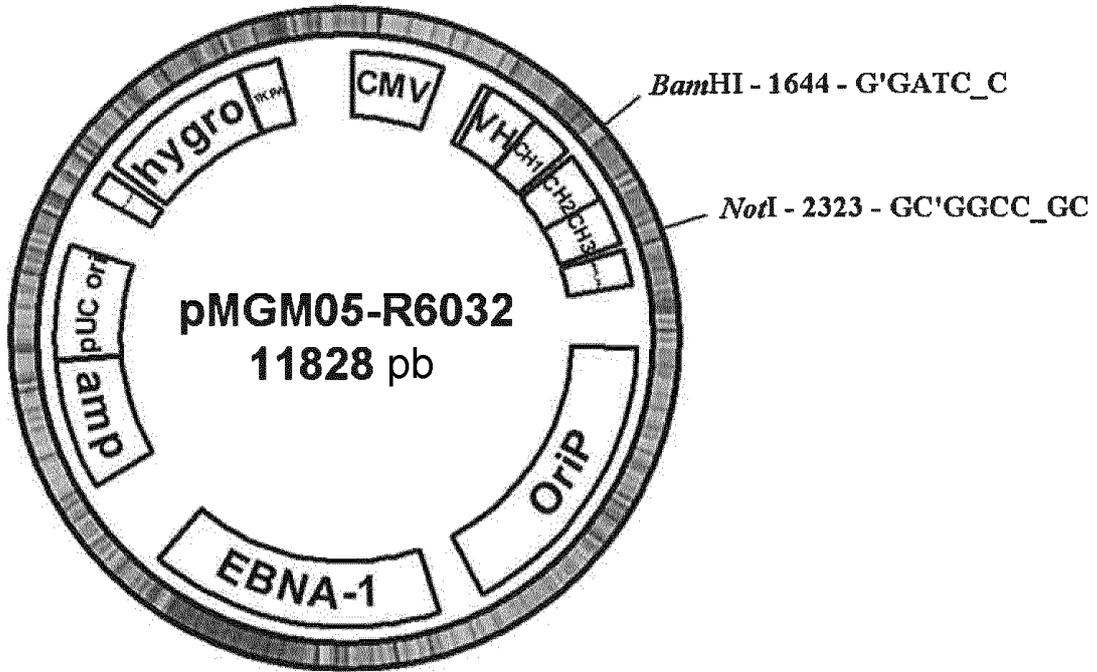


Figura 2