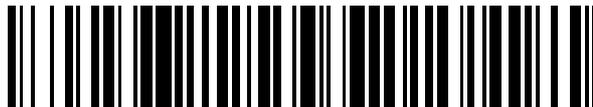


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 979**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/EP2013/064330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13735254 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2869845**

54 Título: **Proteína dimérica con mutaciones triples**

30 Prioridad:

06.07.2012 WO PCT/EP2012/063339

10.01.2013 DK 201300019

10.01.2013 US 201361751045 P

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

07.05.2020

73 Titular/es:

GENMAB B.V. (100.0%)

Uppsalalaan 15

3584 CT Utrecht, NL

72 Inventor/es:

DE JONG, ROB N.;

BEURSKENS, FRANK;

PARREN, PAUL;

LABRIJN, ARAN FRANK;

SCHUURMAN, JANINE;

VLUG, ARJEN y

VERPLOEGEN, SANDRA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 758 979 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

Proteína dimérica con mutaciones triples

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas diméricas, p. ej. anticuerpos, que comprenden al menos tres mutaciones en comparación con una proteína dimérica parental. Más concretamente, la presente invención se refiere a tales proteínas diméricas que son capaces de formar estructuras oligoméricas, p. ej. hexaméricas, en solución. La presente invención también se refiere a los usos de tales proteínas diméricas y a composiciones que comprenden tales proteínas diméricas.

Antecedentes de la invención

15 Las funciones efectoras mediadas por la región Fc de un anticuerpo permiten la destrucción de entidades foráneas, tales como la destrucción de patógenos y el aclaramiento y la degradación de antígenos. La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) se inician uniendo la región Fc a las células portadoras de receptores de Fc (FcR), mientras que la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se inicia por la unión de la región Fc a C1q, que inicia la ruta clásica de activación del complemento.

Cada anticuerpo IgG contiene dos sitios de unión para C1q, uno en cada región constante de la cadena pesada (Fc). Sin embargo, una sola molécula de IgG en solución no activa el complemento ya que la afinidad de la IgG monomérica por C1q es bastante débil ($K_d \sim 10^{-4}$ M) (Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem 248,2818-13; Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol 16.697-701) La asociación de IgG dirigida por antígenos puede conducir a una unión mucho más estrecha de la molécula C1q multivalente ($K_d \sim 10^{-8}$ M) y a la activación del complemento (Burton et al., 1990 Mol. Immunol 22, 161-206). Por el contrario, la IgM existe de forma natural en pentámeros o hexámeros unidos covalentemente, y tras la unión del antígeno celular expresado o inmovilizado, los pentámeros y hexámeros de IgM pueden producir eficazmente CDC. La unión al antígeno es un requisito para inducir un cambio conformacional en IgM para exponer los sitios de unión de C1q (Feinstein et al., 1986, Immunology Today, 169-174).

Se ha sugerido que también la IgG puede lograr la activación del complemento mediante la formación de estructuras de anillo hexaméricas, a través de la interacción de los dominios CH2/CH3 de la región Fc (Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69). Se ha encontrado evidencia que respalda la existencia de tales estructuras hexaméricas de IgG en dos dimensiones (Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4^a ed. (Weir, D. M. ed.), pág. 17.1-17.5. Blackwell, Edimburgo; Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5) y cristales tridimensionales, así como para IgG1, IgG2a e IgG4 y Fc humano en solución (Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115). También se observó una formación de anillo hexamérico en la estructura cristalina del anticuerpo IgG1k humano b12 dirigido contra gp120 de VIH-1 (1HZH en PDB) (Saphire et al., Science 10 agosto 2001; 293 (5532), 1155-9). En el anillo hexamérico de b12, estaban presentes seis sitios de unión a C1q accesibles sobre la superficie del hexámero, uno de cada uno de los seis anticuerpos, mientras que los otros seis sitios de unión estaban orientados hacia abajo.

C1q se asemeja a un ramo de tulipanes con seis cabezas globulares, que contienen las regiones de combinación con anticuerpos, atados a seis tallos de colágeno [Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26; Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77; Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12; Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81]. Se encontró que C1q se ajustaba al ensamblaje hexamérico b12 de la estructura cristalina 1HZH, de modo que cada una de las seis cabezas globulares estaba en contacto con uno de los seis sitios de unión de C1q (Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5- 10 de julio de 2010; "Crystal Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Tesis de Erica Ollmann Saphire, para el Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, California. Noviembre 2000). Se observó que las mutaciones en aminoácidos seleccionados en las interfases de Fc observadas entre los anticuerpos b12 relacionados con la simetría en la estructura cristalina disminuyen la avidéz de unión de C1q, lo que indica la contribución de estos aminoácidos a la interacción intermolecular Fc:Fc.

Mekhaieel DNA et al., Nature Scientific Reports, 1:124, 19 de octubre de 2011, describen proteínas de fusión de Fc humanas poliméricas con funciones efectoras modificadas.

El documento WO0042072 describe variantes de polipéptidos con funciones efectoras alteradas.

El documento US20080089892 describe variantes de la región Fc.

El documento WO2006105062 describe regiones Fc de anticuerpos alteradas y los usos de las mismas.

El documento WO2006104989 describe que una sustitución K439P en un anticuerpo mejora la función efectora, mientras que una sustitución E345W mejora la ADCC y la unión de FcRn. El documento WO2005047327 describe la introducción de las sustituciones E345G, E345R o E430K para mejorar la unión de FcRn. El documento WO2010106180 describe que las sustituciones E345Q y E345G aumentan la unión al receptor FcRn. El documento
 5 WO2005070963 revela que una sustitución S440Y en un anticuerpo mejora la CDC.

La presente invención se refiere a proteínas diméricas que comprenden ciertos residuos de aminoácido, en donde seis de dichas proteínas diméricas son capaces de formar formas hexaméricas no covalentes en solución.

10 **Compendio de la invención**

En un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína dimérica que comprende un primer y un segundo polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido al menos las regiones C_H2 y C_H3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en donde al menos uno de los polipéptidos comprende una región de unión que se une específicamente a una diana, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son R, G e Y, respectivamente; o
 15 alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, que está predominantemente en forma oligomérica, en un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 6,8, que está predominantemente en forma monomérica a un pH de menos de 6,0, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración de EU expuesta en Kabat.

La presente descripción también se refiere a un oligómero que comprende al menos dos proteínas diméricas asociadas no covalentemente de la presente invención.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un hexámero que comprende seis proteínas diméricas asociadas no covalentemente de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende la proteína dimérica de la presente invención y/o el hexámero de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una primera proteína dimérica según la presente invención, una segunda proteína dimérica según la presente invención, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para aumentar la oligomerización en solución de una proteína dimérica que comprende un primer y segundo polipéptidos, cada uno de los cuales comprende al menos las regiones C_H2 y C_H3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, comprendiendo el método la introducción en dicho primer y segundo polipéptidos, de las sustituciones de aminoácidos en al menos las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana que son R, G e Y, respectivamente; o
 40 o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración Eu como se expone en Kabat.

45 La presente descripción también se refiere a una proteína dimérica variante preparada por el método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de partes que comprende una primera proteína dimérica según la presente invención y una segunda proteína dimérica según la presente invención para uso simultáneo, separado o secuencial en generación de imágenes, diagnóstico o terapia.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición o kit de partes de acuerdo con la invención, para su uso en la generación de imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición o kit de partes de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana, viral o parasitaria, para obtener imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero, o para modular el aclaramiento de una molécula diana del cuerpo de un organismo humano u otro mamífero.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición, kit de partes de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, rechazos de trasplantes de órganos y agotamiento de C1q en el sistema humoral en un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: (A) Representación esquemática de moléculas de IgG en formación de hexámero.

5 **Figura 2:** Alineamiento de secuencia de los segmentos Fc de IgG1, IgG1f, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM humanos correspondientes a los residuos P247 a K447 en la cadena pesada de IgG1, utilizando el soporte lógico Clustal 2.1, numerado por el índice Eu como es expone en Kabat. La secuencia de la IgG1 mostrada (SEQ ID NO: 6) representa los residuos 130 a 330 de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 1; Número de acceso UniProt P01857) y la secuencia de la IgG1m(f) mostrada (SEQ ID NO: 7) representa los residuos 130 a 330 de la variante alotípica IgG1m(f) (SEQ ID NO: 5); la secuencia de la IgG2 mostrada (SEQ ID NO: 8) representa los residuos 126 a 326 de la región constante de la cadena pesada de IgG2 (SEQ ID NO: 2; Núm. de acceso UniProt P01859); y la secuencia de la IgG3 mostrada (SEQ ID NO: 9) representa los residuos 177 a 377 de la región constante de la cadena pesada de IgG3 (SEQ ID NO: 3; Núm. de acceso UniProt P01860); y la secuencia de la IgG4 mostrada (SEQ ID NO: 10) representa los residuos 127 a 327 de la región constante de la cadena pesada de IgG4 (SEQ ID NO: 4; Núm. de acceso UniProt P01861); y la secuencia de la IgE mostrada (SEQ ID NO: 11) representa los residuos 225-428 de la región constante de IgE (Núm. de acceso Uniprot P01854); y la secuencia de la IgA1 mostrada (SEQ ID NO: 12) representa los residuos 133-353 de la región constante de IgA1 (Núm. de acceso Uniprot P01876); y la secuencia de la IgA2 mostrada (SEQ ID NO: 13) representa los residuos 120-340 de la región constante de IgA2 (SEQ ID NO: 8; Núm. de acceso de Uniprot P01877); y la secuencia de la IgM mostrada (SEQ ID NO: 14) representa los residuos 230-452 de la región constante de IgM (Núm. de acceso Uniprot P01871); y la secuencia de la IgD mostrada (SEQ ID NO: 15) representa los residuos 176-384 de la región constante de IgD (número de acceso Uniprot P01880).

25 **Figura 3A y B:** Alineamiento de secuencia del anticuerpo anti-EGFr 2F8 en una cadena principal de IgG1 (SEQ ID NO: 3), IgG4 (SEQ ID NO: 5) e IgG3 (parcial) (SEQ ID NO: 6). Se representan la numeración de aminoácidos según Kabat y según el índice Eu (ambos descritos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)).

30 **Figura 4:** Vista detallada de las interacciones K439/S440 entre el Fc de las moléculas adyacentes (Fc y Fc', respectivamente) en una disposición oligomérica (p. ej., Hexamérica), que ilustra la interacción entre las moléculas Fc y Fc' no modificadas de tipo salvaje.

35 **Figura 5:** CDC mediada por mutantes del anticuerpo contra CD38 HuMAb 005 en células positivas para CD38. (A) Eficacia de CDC en células Daudi por una serie de concentraciones de 005 mutantes. (B) Eficacia de CDC en células Raji mediante una serie de concentraciones de mutantes de HuMAb 005. (C) Eficacia de CDC del mutante de E345R HuMAb 005 con 20% o 50% de NHS en células Wien133. (D) Eficacia de CDC de mutantes E345R de HuMAb 005 y 7D8 con 20% o 50% de NHS en células Raji. Se sometieron a prueba muestras de anticuerpos sin purificar aisladas de transfecciones transitorias. Como control negativo, se utilizó el sobrenadante de células transfectadas simuladamente.

45 **Figura 6:** CDC por mutantes de tipo salvaje y E345R del anticuerpo contra CD38 HuMAb 005 en un experimento de competición con un péptido de unión a Fc. La lisis celular se midió después de la CDC en células Daudi opsonizadas con anticuerpo incubadas con una serie de concentraciones del péptido DCAWHLGELVWCT de unión a Fc (SEQ ID NO: 7). Se utilizaron muestras de anticuerpos sin purificar aisladas de transfecciones transitorias. Como control negativo, se utilizó el sobrenadante de células transfectadas simuladas.

50 **Figura 7:** CDC en células Wien133 positivas para CD20 y CD38 mediante mutantes 7D8 de anticuerpo contra CD20 (A), mutantes 005 de anticuerpo contra CD38 (B), mezclas de mutantes 005 de anticuerpo contra CD38 y mutantes 7D8 de anticuerpo contra CD20 (C) y (D).

55 **Figura 8A y B:** Evaluación de la eficacia *in vivo* de IgG1-005-E345R en un modelo de xenoinjerto subcutáneo con células Raji-luc núm. 2D1.

Figura 9: CDC en células Wien133 positivas para CD38, positivas para EGFR por anticuerpo biespecifico contra CD38/EGFR con la mutación E345R.

60 **Figura 10A y B:** CDC en células en células Wien133 o células Raji positivas para CD20, negativas para CD38 por el anticuerpo biespecifico contra CD20/CD38 con y sin la mutación E345R.

Figura 11: CDC en células A431 positivas para EGFR por el anticuerpo contra EGFR 2F8 con la mutación E345R.

Figura 12A y B: CDC mediada por anticuerpos mutantes E345R.

Figura 13: Análisis de co-localización de anticuerpos contra TF (FITC) con marcador lisosomal LAMP1 (APC).

5 **Figura 14A-D:** La introducción de E345R dio como resultado una destrucción mediada por CDC mejorada en comparación con el rituximab de tipo salvaje sometido a prueba en diferentes líneas de células B.

10 **Figura 14E:** La introducción de E345R dio como resultado una destrucción máxima mejorada mediada por CDC en comparación con el rituximab de tipo salvaje, independientemente de los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del complemento CD46 (A), CD55 (B) o CD59 (C) en diferentes líneas de células B con niveles de expresión de CD20 comparables.

15 **Figura 15:** Cinética de CDC. Los anticuerpos E345R dan como resultado una lisis de células diana más rápida y sustancial por CDC en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje.

Figura 16: Cinética de CDC. La introducción de la mutación E345R en el anticuerpo biespecífico CD38xCD20 da como resultado una lisis de células diana mediada por CDC más rápida y más sustancial.

20 **Figura 17:** Cinética de CDC. La introducción de la mutación E345R en el anticuerpo biespecífico EGFRxCD38 que se une monovalentemente a las células Raji negativas para EGFR da como resultado una lisis de células diana mediada por CDC más rápida y sustancial que EGFRxCD38 biespecífico sin la mutación E345R.

25 **Figura 18A-F:** CDC en células Wien133 mediante una combinación de un anticuerpo de tipo salvaje con un anticuerpo mutante que contiene (A-C) E345R y Q386K o (D-F) E345R, E430G y Q386K. Los mutantes IgG1-b12 no se unen a las células Wien133 y se usaron como anticuerpos de control negativo.

30 **Figura 19:** Eficacia de CDC de los anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que contienen la mutación E345R.

35 **Figura 20:** La introducción de la mutación E345R estabilizadora de Fc-Fc en el anticuerpo contra CD38 005 de tipo salvaje da como resultado una mejor destrucción de las células CLL primarias en un ensayo de CDC *ex vivo* (promedio \pm error típico de la media).

40 **Figura 21:** Análisis PAGE de la variante de anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y. Panel izquierdo: SDS-PAGE, condiciones no reductoras. Panel central: SDS-PAGE, condiciones reductoras. Panel derecho: PAGE nativa. Nota: Calle 1: anticuerpo de control IgG1-b12. Calle 2: IgG1-005-E345R/E430G. Calle 3: IgG1-005-E345R/E430G/S440Y.

45 **Figura 22:** Análisis HP-SEC del anticuerpo IgG1-005 de tipo salvaje. El monómero de la fracción (es decir, anticuerpos individuales) se estimó en $> 99\%$.

Figura 23: Análisis HP-SEC de la variante de anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y. El oligómero de la fracción se estimó en aproximadamente 79% .

Figura 24: Superposición de los perfiles HP-SEC del anticuerpo IgG1-005 de tipo salvaje (línea discontinua) e IgG1-005-E345R/E430G/S440Y (línea continua).

50 **Figura 25:** ELISA de unión a C1q con IgG1-005, IgG1-005-E345R/E430G/S440Y e IgG1-005-E345R. Las series de concentración de los anticuerpos indicados se aplicaron como recubrimiento sobre los pocillos y se incubaron con C1q de concentración fija.

55 **Figura 26:** Eficacia de CDC mediante una serie de concentraciones de IgG1-005-WT, IgG1-005-E345R/E430G/S440Y e IgG1-005-E345R en células Ramos positivas para CD38.

Figura 27: Ensayo informador de ADCC utilizando células Raji positivas para CD38 y una serie de concentraciones de IgG1-005-WT, IgG1-005-E345R/E430G/S440Y e IgG1-005-E345R

60 **Figura 28:** Concentraciones plasmáticas de IgG humana en ratones SCID a lo largo del tiempo según lo determinado por ELISA de IgG humana total. Círculos de color negro: IgG1-005 de tipo salvaje; triángulos de color negro: IgG1-005-E345R/E430G/S440Y.

Figura 29: Tasa de aclaramiento de IgG humana administrada en ratones SCID según lo determinado por ELISA anti-CD38. Círculos de color negro: IgG1-005 de tipo salvaje; triángulos de color negro: IgG1-005-

E345R/E430G/S440Y.

Figura 30: Perfil HP-SEC de IgG1-005 en Na₂SO₄ 0,1 M/fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8.

5 **Figura 31:** Perfil HP-SEC de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y en Na₂SO₄ 0,1 M/fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8.

Figura 32: Superposición de perfiles HP-SEC de IgG1-005 en NaCl 0,15 M/citrato 0,1 M pH 6,8 (línea discontinua) y pH 5,0 (línea continua).

10 **Figura 33:** Perfil HP-SEC de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y en NaCl 0,15 M/citrato 0,1 M pH 6,8 (línea discontinua) y pH 5,0 (línea continua).

Figura 34: Análisis HP-SEC de anticuerpos triples mutantes IgG1-005-RGY, IgG-7D8-RGY, IgG1-ritux-RGY, IgG1-2F8-RGY e IgG1-M1-RGY.

15 **Figura 35:** Los anticuerpos contra CD20 triples mutantes E345R/E430G/S440Y muestran una mayor destrucción de las células CLL positivas para CD20 primarias en un ensayo ex vivo con anticuerpos derivados de 7D8 (A) y anticuerpos derivados de rituximab (B).

20 **Figura 36:** Análisis HP-SEC de IgG1-005-RGY (A), IgG2-005-RGY (B), IgG3-005-RGY (C) e IgG4-005-RGY (D). Los porcentajes indican multímeros totales como fracción del área del pico total.

Figura 37: Eficacia de CDC mediante una serie de concentraciones de variantes de anticuerpos 005 en diferentes cadenas principales de isotipo IgG en células Daudi (A) y Wien133 (B) positivas para CD38.

25 **Figura 38:** Análisis HP-SEC de IgG1-005-KGY (A), IgG1-005-RSY (B), IgG1-005-RGW (C) e IgG1-005-RGI (D).

30 **Figura 39:** Eficacia de CDC mediante una serie de concentraciones de IgG1-005-RGY, IgG1-005-KGY, IgG1-005-RSY, IgG1-005-RGW e IgG1-005-RGI en células Wien133 (A) y Ramos (B) positivas para CD38.

Figura 40: Análisis HP-SEC de IGG1-005-RGE, IgG1-005-RGK y una mezcla de IgG1-005-RGE + IgG1-005-RGK (UA indica "unidades arbitrarias").

35 **Figura 41:** Análisis HP-SEC de IgG1-005-RGE, IgG1-005-RGIK y una mezcla de IgG1-005-RGE + IgG1-005-RGIK (UA indica "unidades arbitrarias").

Figura 42: Superposición de trazas de HP-SEC de la mezcla IgG1-005-RGE + IgG1-005-RGK y la mezcla IgG1-005-RGE + IgG1-005-RGIK (UA indica "unidades arbitrarias").

40 **Figura 43:** Análisis HP-SEC del fragmento de Fc triple mutante (Fc-RGY).

Figura 44: Análisis FACS de células A431 (A) y Daudi (B) incubadas con mezclas de Fc-RGY-647 con anticuerpos IgG1-RGY de longitud completa.

45 **Figura 45 A y B:** Análisis HP-SEC de IgG1-005-RGY a diferentes niveles de pH. Los porcentajes indican oligómeros totales como fracción del área del pico total.

Figura 46: La muerte celular programada se induce en diferentes variantes isotípicas de anticuerpos IgG mediante la introducción de la triple mutación RGY.

50 **Figura 47:** Análisis HP-SEC de IgG1-005-RGY (línea continua) e IgM-005 hexamérica (línea discontinua).

Figura 48: Eficacia de CDC por una serie de concentraciones de IgG1-005, IgG1-005-RGY, IgM-005 en células Daudi (A) y Wien133 (B) positivas para CD38.

55 **Figura 49:** Ensayo in vitro de CDC con IgG1-2F8-RGY en líneas de células tumorales sólidas células A431 (A) y Difi (B).

60 **Figura 50:** C4d producido por anticuerpos en suero humano normal como medida para la activación del complemento en solución.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 5 El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas de polipéptidos, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase por ejemplo *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada típicamente está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada típicamente está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las cadenas pesadas están interconectadas mediante enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Cada cadena ligera típicamente está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera típicamente está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en la secuencia y/o la forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901917 (1987)). A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran en la presente memoria de acuerdo con el índice o numeración Eu (descrito en Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Edición - Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH Núm. 91-3242, pág. 662,680,689 (1991)).
- 10
- 15
- 20
- 25 Se pretende que el término "región bisagra" como se emplea en la presente memoria haga referencia a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu establecida en Kabat.
- 30 Se pretende que el término "región CH2" o "dominio CH2" como se emplea en la presente memoria haga referencia a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 231-340 según el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en la presente memoria.
- 35 Se pretende que el término "región CH3" o "dominio CH3" como se emplea en la presente memoria haga referencia a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 según el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en la presente memoria.
- 40 "Región Fc", "fragmento Fc" o "dominio Fc", que se pueden usar indistintamente en la presente memoria, se refieren a una región de anticuerpo que comprende, en la dirección N terminal a C terminal, al menos una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Una región Fc de un anticuerpo IgG1 se puede generar, por ejemplo, por digestión de un anticuerpo IgG1 con papaína.
- 45 El término "fragmento Fab" en el contexto de la presente invención, se refiere a un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, que comprende las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, así como la región constante de la cadena ligera y la región CH1 de una inmunoglobulina. La "región CH1" se refiere, p. ej., a la región de un anticuerpo IgG1 humano correspondiente a los aminoácidos 118-215 según el sistema de numeración Eu. Por lo tanto, el fragmento Fab comprende la región de unión de una inmunoglobulina.
- 50 El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente ocho horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o un tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). El anticuerpo de la presente invención comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno. Un anticuerpo generalmente contiene dos regiones CH2-CH3 y una región de conexión, p. ej. una región bisagra, p. ej. al menos un dominio Fc. Así, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una región Fc y una región de unión a antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un
- 55
- 60

antígeno. Las regiones constantes o "Fc" de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico o una molécula similar. El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítomos diferentes, típicamente no solapantes. Tales epítomos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes. Si los epítomos están en dianas diferentes, tales dianas pueden estar en la misma célula o en diferentes células o tipos de células. Como se indicó anteriormente, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto, el término anticuerpo en la presente memoria incluye fragmentos de un anticuerpo que comprenden al menos una porción de una región Fc y que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Tales fragmentos se pueden proporcionar mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "Ab" o "anticuerpo" incluyen, sin limitación, anticuerpos monovalentes (descritos en el documento WO2007059782 por Genmab); anticuerpos de cadena pesada, que consisten solamente en dos cadenas pesadas y se producen naturalmente, p. ej., en camélidos (p. ej. Hamers-Casterman (1993) *Nature* 363:446); ThioMabs (Roche, documento WO2011069104), dominio modificado por ingeniería genética de intercambio de hebra (SEED o Seed-body) que son moléculas de tipo anticuerpo asimétricas y biespecíficas (Merck, documento WO2007110205); Triomab (Fresenius, Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155:219); FcΔAdp (Regeneron, documento WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, documento WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, documento WO2011/028952), Inmunoglobulina de dominio variable doble (Abbott, DVD-Ig, Patente de Estados Unidos Núm. 7.612.181); Anticuerpos de doble cabeza de dominio doble (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), Di-diacuerpo (ImClone/Eli Lilly), formatos de anticuerpos de Botones en ojales (Genentech, documento WO9850431); DuoBody (Genmab, documento WO 2011/131746); Formatos de anticuerpos orientados por interacción electrostática (Amgen, documentos EP1870459 y WO 2009089004; Chugai documento US201000155133; Oncomed, documento WO2010129304A2); IgG1 e IgG2 biespecíficas (Rinat Neurosciences Corporation, documento WO11143545), CrossMAbs (Roche, documento WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus), Anticuerpos de dominio de direccionamiento doble (GSK/Domantis), Anticuerpos dos en uno que reconocen dos dianas (Genentech, NovImmune), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), CovX-body (CovX/Pfizer), biespecíficos similares a IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J. et al., *J Immunol Methods*, 2007. 318(1-2): pág. 65-74), y DIG-body y PIG-body (Pharmabccine), y moléculas de redireccionamiento de afinidad doble (Fc-DART o Ig-DART, de MacroGenics, documentos WO/2008/157379, WO/2010/080538), Zybodies (Zyngenia), enfoques con cadena ligera común (Crucell/Merus, documento US7262028) o cadenas pesadas comunes (κλBodies de NovImmune), así como proteínas de fusión que comprenden una secuencia de polipéptidos fusionada a un fragmento de anticuerpo que contiene fusiones scFv de tipo dominio Fc, como BsAb de ZymoGenetics/BMS), HERCULES de Biogen Idec (documento US007951918), SCORPIONS de Emergent BioSolutions/Trubion, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N. et al., *J Mol Biol*, 2009. 393(3): pág. 672-92), fusiones de scFv de Novartis, fusiones de scFv de Changzhou Adam Biotech Inc (documento CN 102250246), TvAb de Roche (documentos WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² de f-Star (documento WO2008/003116), y fusiones de scFv dobles. También se debe entender que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (tales como anticuerpos monoclonales humanos), mezclas de anticuerpos (policlonales recombinantes), por ejemplo, generados por tecnologías explotadas por Symphogen y Merus (Oligoclonics), y polipéptidos de tipo anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer potencialmente cualquier isotipo.

El término "anticuerpo de longitud completa" cuando se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo parental o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera correspondientes a los que normalmente se encuentran en un anticuerpo de tipo salvaje de ese isotipo.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones, inserciones o deleciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

Los términos "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "mAb", o similares, como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una preparación de moléculas de Ab de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítomo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a Ab que muestran una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias

de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAb humanos pueden ser generados por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transgénico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un repertorio transgénico de cadena pesada humana y un repertorio transgénico de cadena ligera, reorganizado para producir un anticuerpo humano funcional y fusionado a una célula inmortalizada.

Como se emplea en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE o IgM o cualquiera de sus alotipos tales como IgG1m(za) e IgG1m(f)) que está codificado por genes de región constante de cadena pesada. Adicionalmente, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

El término "anticuerpo monovalente" significa, en el contexto de la presente invención que una molécula de anticuerpo solamente es capaz de unirse con un dominio de unión del anticuerpo a un antígeno, p. ej., tiene una única interacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto no es susceptible de entrecruzamiento de antígenos.

Una "región de unión" como se emplea en la presente memoria puede ser una secuencia de polipéptidos, tal como una proteína, ligando de proteína, receptor, una región de unión a antígeno, o una región de unión a ligando capaz de unirse a una diana asociada con una célula, bacteria, virión, o similar. Una región de unión puede comprender, p. ej. parte de un receptor, ligando del receptor o región de unión a antígeno de una inmunoglobulina o anticuerpo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "diana" se entiende en el contexto de la presente invención como una molécula a la que se une la región de unión del polipéptido que comprende un CH2, CH3, y opcionalmente una región bisagra, y una región de unión. Cuando se emplea en el contexto de la unión de un anticuerpo, incluye cualquier antígeno hacia el cual se dirige el anticuerpo originado. Los términos "antígeno" y "diana" se pueden utilizar en relación con un anticuerpo de manera indistinta y constituyen el mismo significado y propósito con respecto a cualquier aspecto o realización de la presente invención.

Como se emplea en la presente memoria, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado es típicamente una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, p. ej. 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos, o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), en ese caso la cantidad con la cual la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces. El término " K_D (M)", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Una "variante" denota una molécula, p. ej. proteína dimérica o que comprende una o más mutaciones en comparación con una "molécula parental", p. ej. "proteína dimérica parental", tal como un "anticuerpo parental". Para una variante de anticuerpo, los formatos de anticuerpos parentales ilustrativos incluyen, sin limitación, un anticuerpo de tipo salvaje, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo que contiene Fc, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo humano o cualquier combinación de los mismos. Las mutaciones ilustrativas incluyen deleciones, inserciones y sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos parental. Las sustituciones de aminoácidos pueden intercambiar un aminoácido nativo por otro aminoácido natural, o por un derivado de aminoácido de origen no natural. La sustitución de aminoácidos puede ser conservativa o no conservativa. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas se pueden definir como sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

Clases de residuos de aminoácido para sustituciones conservativas

Residuos Ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Residuos Alcalinos	Lys (K), Arg (R) y His (H)
Residuos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Residuos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Residuos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Residuos Aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

Clases alternativas de sustitución de residuos de aminoácido conservativos

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácido

Residuos que contienen grupos alcohol	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V, y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W, e Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, e Y
Residuos cargados negativamente	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T
Residuos cargados positivamente	H, K, y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T, y V
Residuos muy pequeños	A, G, y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

5 En el contexto de la presente invención, una sustitución en una variante se indica como:

Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;

10 En referencia a la nomenclatura bien reconocida para los aminoácidos, se utilizan el código de tres letras o el código de una letra, incluidos los códigos Xaa y X para indicar el residuo de aminoácido. En consecuencia, la notación "E345R" o "Glu345Arg" significa que la variante comprende una sustitución de ácido glutámico por arginina en la posición de aminoácido variante correspondiente al aminoácido en la posición 345 en el anticuerpo original, cuando los dos están alineados como se indica abajo.

15 Cuando una posición como tal no está presente en un anticuerpo, pero la variante comprende una inserción de un aminoácido, por ejemplo:

Posición - aminoácido sustituido; se utiliza la notación, p. ej., "448E".

20 Tal notación es particularmente relevante en relación con las modificaciones en una serie de polipéptidos o anticuerpos homólogos.

De manera similar, cuando la identidad de los residuos de aminoácido de la sustitución es irrelevante:

25 Aminoácido original - posición; o "E345".

Para una modificación en la que los aminoácidos originales y/o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, la sustitución de Ácido glutámico por Arginina, Lisina o Triptófano en la posición 345:

30 Se pueden utilizar indistintamente "Glu345Arg, Lys, Trp" o "E345R, K, W" o "E345R/K/W" o "E345 a R, K o W" en el contexto de la invención.

35 Además, el término "una sustitución" abarca una sustitución a cualquiera de los otros diecinueve aminoácidos naturales, o a otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido E en la posición 345 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W, 345P y 345Y. Esto es, por cierto, equivalente a la designación 345X, en donde la X designa cualquier aminoácido distinto del aminoácido original. Estas sustituciones

también se pueden designar E345A, E345C, etc., o E345A, C, etc., o E345A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones mencionadas en la presente memoria, para incluir específicamente en la presente memoria cualquiera de tales sustituciones.

5 Los términos "aminoácido" y "residuo de aminoácido" se pueden utilizar indistintamente.

La referencia a "D/E356" se refiere en el presente contexto a variantes alotípicas en la secuencia de IgG1 humana. En el alotipo IgG1m(za) de la IgG1 humana, el aminoácido en la posición 356 es D, mientras que en el alotipo IgG1m(f) de la IgG1 humana, el aminoácido en la posición 356 es E.

10 A menos que se indique lo contrario o lo contradiga el contexto, la referencia a un número de posición de aminoácido se refiere al número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana.

15 Un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde" a un aminoácido o segmento en otra secuencia es uno que (i) se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa de alineamiento de secuencia convencional tal como ALIGN, ClustalW o similar, típicamente en la configuración predeterminada y (ii) tiene una identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 de al menos 50%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%. Por ejemplo, los alineamientos de secuencia mostradas en las Figuras 2 y 3 se pueden utilizar para identificar cualquier aminoácido en las secuencias de Fc de inmunoglobulina mostradas que corresponde a un aminoácido particular en la secuencia Fc de IgG1.

20 Para los fines de la presente invención, un aminoácido en una posición en una secuencia de aminoácidos que corresponde a una posición específica en otra secuencia de aminoácidos de referencia, así como el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos, se pueden determinar mediante alineamiento de las dos secuencias. En la presente memoria, a menos que se indique lo contrario o lo contradiga el contexto, la secuencia de aminoácidos de referencia es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgG1 humana. Se puede utilizar el programa "Align", que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento) para el alineamiento de secuencias de polipéptidos, así como de nucleótidos. Se puede utilizar la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 o BLOSUM62 para los alineamientos de polipéptidos, y se puede utilizar la matriz de identidad predeterminada para alineamientos de nucleótidos, la penalización del primer residuo de un hueco es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones por residuos adicionales de un hueco son -2 para polipéptidos y -4 para nucleótidos. "Align" forma parte del paquete FASTA versión v20u6 (véase W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98). Los alineamientos de proteínas FASTA utilizan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño de hueco (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197). Los alineamientos representativos entre las regiones Fc de las cadenas pesadas de inmunoglobulina se muestran en las Figuras 2 y 3.

40 Se pretende que el término "vector", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de inducir la transcripción de un segmento de ácido nucleico ligado al vector. Un tipo de vector es un "plásmido", que tiene la forma de un bucle de ADN de doble hebra circular. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde el segmento de ácido nucleico puede estar ligado al genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (tales como los vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de este modo se replican junto con el genoma del anfitrión. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores virales (tales como retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus asociados a adeno), cumplen funciones equivalentes.

55 Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Se debe entender que se pretende que tales términos hagan referencia no solamente a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria. Las células anfitrionas recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, células PER.C6, NS0 y células linfocíticas, y células procarióticas tales como *E. coli* y otros anfitriones eucarióticos tales como células vegetales y hongos.

El término "transfectoma", como se emplea en la presente memoria, incluye células anfitrionas eucarióticas recombinantes que expresan el Ab o un antígeno diana, tales como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ilustrativas incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc (FcR) o receptores del complemento y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora tal como, p. ej., una célula asesina natural, es capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, neutrófilos, las células dendríticas y células de Kupffer que expresan los FcR están implicados en la destrucción específica de las células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a las células presentadoras de antígenos. En algunas realizaciones, la ADCC se puede potenciar adicionalmente mediante la activación clásica del complemento dirigida por anticuerpos que da como resultado el depósito de fragmentos C3 activados sobre la célula diana. Los productos de escisión C3 son ligandos para los receptores del complemento (CR), tales como CR3, expresados sobre células mieloides. El reconocimiento de fragmentos del complemento por los CR sobre las células efectoras puede promover una ADCC mediada por el receptor de Fc mejorada. En algunas realizaciones, la activación clásica del complemento dirigida por anticuerpos conduce a fragmentos C3 sobre la célula diana. Estos productos de escisión C3 pueden promover la citotoxicidad celular directa dependiente del complemento (CDCC). En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, una partícula diana o una célula diana. La expresión de un receptor de FcR o receptor del complemento particular sobre una célula efectora puede estar regulada por factores humorales tales como las citocinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de FcγRI está regulada por incremento por el interferón γ (IFN γ) y/o G-CSF. Esta expresión mejorada aumenta la actividad citotóxica de las células portadoras de FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o fagocitar o lisar una célula diana. En algunas realizaciones, la activación clásica del complemento dirigida por anticuerpos conduce a fragmentos C3 sobre la célula diana. Estos productos de escisión de C3 pueden promover la fagocitosis directa por las células efectoras o indirectamente al mejorar la fagocitosis mediada por anticuerpos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "funciones efectoras" se refiere a funciones que son consecuencia de la unión de una proteína dimérica, tal como un anticuerpo, a su diana, tal como un antígeno, opcionalmente sobre una célula, sobre una membrana celular, sobre un virión, o sobre otra partícula. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen (i) unión a C1q, (ii) activación del complemento, (iii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), (iv) formación de oligómeros, (v) estabilidad del oligómero, (vi) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), (vii) unión a FcRn, (viii) unión a receptor de Fc-gamma, (ix) fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), (x) citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), (xi) citotoxicidad potenciada por el complemento, (xii) unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado mediada por anticuerpos, (xiii) internalización, (xiv) modulación por disminución, (xv) inducción de apoptosis, (xvi) opsonización, (xvii) modulación de la proliferación, tal como reducción, inhibición o estimulación de la proliferación, y (xii) una combinación de cualquiera de (i) a (xvi).

Como se emplea en la presente memoria, el término "afinidad" es la fuerza de unión de una molécula, p. ej. un anticuerpo, a otra, p. ej. una diana o antígeno, en un solo sitio, tal como la unión monovalente de un sitio de unión a antígeno individual de un anticuerpo a un antígeno.

Como se emplea en la presente memoria, el término "avidez" se refiere a la fuerza combinada de múltiples sitios de unión entre dos estructuras, tal como entre múltiples sitios de unión a antígeno de anticuerpos que interactúan simultáneamente con una diana o p. ej. entre anticuerpo y C1q. Cuando se encuentra presente más de una interacción de unión, las dos estructuras solamente se disociarán cuando todos los sitios de unión se disocian y, por lo tanto, la tasa de disociación será más lenta que para los sitios de unión individuales, y de ese modo proporcionará una mayor fuerza de unión total eficaz (avidez) en comparación con la fuerza de unión de los sitios de unión individuales (afinidad).

Como se emplea en la presente memoria, el término "oligómero" se refiere a una estructura que consiste en más de una, pero un número limitado de unidades de un tipo específico de molécula (tal como, p. ej., anticuerpo u otras moléculas de proteínas diméricas de acuerdo con la invención) en contraste con un polímero que, al menos en principio, consiste en un número ilimitado de unidades. Por lo tanto, un oligómero consiste en un número limitado de proteínas diméricas de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención. Los oligómeros ilustrativos son dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y dodecameros. A menudo se utilizan prefijos griegos para designar el número de unidades de monómero en el oligómero, estando compuesto por ejemplo, un tetrámero de cuatro unidades y un hexámero de seis unidades. Del mismo modo, se pretende que el término "oligomerización", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a un procedimiento que convierte las

moléculas en un grado finito de polimerización. En la presente memoria, se observa que los anticuerpos y/u otras proteínas diméricas de acuerdo con la invención pueden formar oligómeros, tales como hexámeros, mediante asociación no covalente de dominios Fc en solución bajo ciertas condiciones de pH, como se describe en el Ejemplo 31, o en el caso de proteínas diméricas que comprenden regiones de unión a la diana, después de la unión a la diana, p. ej., en una superficie celular. La oligomerización en solución se puede evaluar, p. ej., como se describe en el Ejemplo 20. En una realización particular, la oligomerización en solución se puede determinar realizando fraccionamiento por HP-SEC (cromatografía de exclusión por tamaño a alta presión) utilizando una resina de cromatografía de exclusión por tamaño adecuada con un tamaño de poro capaz de separar moléculas en el intervalo de 50 kDa a 1000 kDa, conectada a un detector de absorbancia; separando en muestras de 50 µL que contienen 1,25 µg/mL de proteína a 1 mL/min en Na₂SO₄ 0,1 M/fosfato de sodio 0,1 M tamponado a pH 6,8; utilizando un soporte lógico adecuado para procesar los resultados; y expresándola por pico como porcentaje del área del pico total. Se puede evaluar la oligomerización de anticuerpos después de la unión al antígeno (p. ej., utilizando una citotoxicidad dependiente del complemento como se describe en los Ejemplos 3, 6 y 21). En una realización particular, la CDC se puede determinar preincubando las células en suspensión a una concentración de 1 x 10⁶ células/mL en placas de 96 pocillos de fondo redondo con un anticuerpo a una concentración final que varía de 0,0003 a 30,0 µg/mL en un volumen total de 100 µL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente; añadiendo suero humano normal a una concentración final de 20%, 30% o 50%; incubando a 37°C durante 45 min; poniendo las placas sobre hielo; añadiendo 10 µL de yoduro de propidio; y determinando la lisis celular por medio de análisis FACS.

Se pretende que el término "unión a C1q", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a la unión de C1q en el contexto de la unión de C1q a un anticuerpo unido a su antígeno. Se debe entender que el anticuerpo unido a su antígeno se produce tanto in vivo como in vitro en el contexto descrito en la presente memoria. La unión de C1q se puede evaluar, por ejemplo, utilizando anticuerpos inmovilizados sobre una superficie artificial (p. ej., plástico en placas para ELISA, como se describe en el ejemplo 21). En una realización particular, la unión de C1q se puede determinar recubriendo placas de ELISA de 96 pocillos durante la noche a 4°C con anticuerpo en PBS a una concentración que varía de 0,007 a 25,0 µg/mL; lavando las placas; bloqueando con 0,5x PBS/Tween 20 al 0,025%/gelatina al 0,1%; incubando secuencialmente durante 1 h a 37°C las placas con suero humano agrupado al 3%, anti-C1q humano de conejo, anti-IgG-HRP de conejo de cerdo, mediante lavado intermedio; desarrollando las placas durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/mL de ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico; añadiendo 100 µL de ácido oxálico al 2%; y midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas. La unión de C1q a un oligómero de anticuerpo se debe entender en la presente memoria como una interacción multivalente que da como resultado una unión de alta avidéz.

Como se emplea en la presente memoria, el término "activación del complemento" se refiere a la activación de la ruta clásica del complemento, que se desencadena por la unión del componente del complemento C1q a un anticuerpo unido a su antígeno. C1q es la primera proteína en los primeros eventos de la cascada clásica del complemento que involucra una serie de reacciones de escisión que culminan en la formación de una actividad enzimática llamada convertasa C3, que escinde el componente del complemento C3 en C3b y C3a. C3b se une covalentemente a C5 en la membrana para formar C5b que a su vez desencadena los eventos tardíos de activación del complemento en los que los componentes terminales del complemento C5b, C6, C7, C8 y C9 se ensamblan en el complejo de ataque de membrana (MAC). La cascada del complemento da como resultado la creación de poros, lo que causa la lisis celular, también conocida como CDC. La activación del complemento se puede evaluar mediante el uso de la cinética de CDC (como se describe en los ejemplos 14, 15 y 16), ensayos de CDC (como se describe en los ejemplos 3 y 21) o mediante el método Deposición celular de C3b y C4b descrito en Beurskens et al 1 de abril, 2012 vol. 188 no. 7 3532-3541.

Se pretende que el término "citotoxicidad dependiente del complemento" ("CDC"), como se emplea en la presente memoria, haga referencia al proceso de activación del complemento mediado por anticuerpos que conduce a la lisis de una célula o virión como resultado de los poros en la membrana que se crean por ensamblaje MAC, cuando el anticuerpo está unido a su diana sobre dicha célula o virión. La CDC se puede evaluar mediante ensayos in vitro, tales como un ensayo de CDC en el que se emplea suero humano normal como fuente de complemento, como se describió anteriormente, p. ej. en los ejemplos 3 y 21.

Se pretende que el término "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" ("ADCC"), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a un mecanismo de destrucción de células diana o viriones recubiertos con anticuerpos por células que expresan receptores de Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La ADCC se puede determinar utilizando métodos tales como, por ejemplo, el ensayo de ADCC descrito en el ejemplo 21. En una realización particular, la ADCC se puede determinar incubando células con anticuerpo a una concentración que varía de 0,5 a 250 ng/mL; y cuantificando la actividad de ADCC con un kit de ensayo con indicador bioluminiscente de ADCC.

Se pretende que el término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" ("ADCP"), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a un mecanismo de eliminación de células diana o viriones recubiertos con

5 anticuerpo por medio de internalización por fagocitos. La célula diana o virión recubiertos con anticuerpos internalizados están contenidos en una vesícula llamada fagosoma, que a continuación se fusiona con uno o más lisosomas para formar un fagolisosoma. La ADCP se puede evaluar mediante el uso de un ensayo de citotoxicidad in vitro con macrófagos como células efectoras y videomicroscopía como describen van Bij et al., en Journal of Hepatology, Volumen 53, Artículo 4, octubre de 2010, páginas 677-685 o como se describe en el ejemplo 24, p. ej. para fagocitos de *S. aureus* mediante PMN.

10 Se pretende que el término "citotoxicidad celular dependiente del complemento" ("CDCC") como se emplea en la presente memoria haga referencia a un mecanismo de destrucción de células diana o viriones por células que expresan receptores del complemento que reconocen productos de escisión del complemento 3 (C3) que están unidos covalentemente a las células diana o viriones como resultado de la activación del complemento mediada por anticuerpos. La CDCC se puede evaluar de manera similar a la descrita para ADCC, pero en presencia de suero humano normal con empobrecimiento de complemento C5.

15 Se pretende que el término "modulación por disminución", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a un procedimiento que disminuye el número de moléculas, tales como antígenos o receptores, sobre una superficie celular, p. ej. mediante la unión de un anticuerpo a un receptor.

20 Se pretende que el término "internalización", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a cualquier mecanismo por el cual una proteína dimérica de la presente invención, p. ej. un anticuerpo o polipéptido que contiene Fc, se internaliza en una célula que expresa la diana desde la superficie celular y/o desde el medio circundante, p. ej., a través de la endocitosis. La internalización de un anticuerpo se puede evaluar utilizando un ensayo directo que mide la cantidad de anticuerpo internalizado (tal como, p. ej., el ensayo de co-localización lisosómica descrito en el Ejemplo 12).

25 El término "muerte celular programada" o "PCD", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la muerte de una célula en cualquier forma mediada por una señalización intracelular. Se encuentran tres formas de PCD; apoptosis, autofagia y necrosis/oncosis. En una realización particular, cualquiera de las tres formas de muerte celular programada se puede determinar cultivando $1,0 \times 10^5$ células durante 24 horas en placas con fondo en U de 96 pocillos en presencia de anticuerpo a una concentración que varía de 0,0025 a 10 $\mu\text{g/mL}$; tiñendo de células muertas con anexina V-FITC utilizando un kit de ensayo de unión a anexina adecuado de acuerdo con las instrucciones del fabricante; y determinando la cantidad de células positivas para anexina V-FITC utilizando análisis FACS.

35 El término "apoptosis", como se emplea en la presente memoria, se refiere al tipo mejor caracterizado de muerte celular programada debido a su importancia en el desarrollo y la homeostasis, y en la patogénesis de diferentes enfermedades, tales como el cáncer. Las células apoptóticas mueren de forma controlada en respuesta a una variedad de señales extrínsecas o intrínsecas (p. ej., activación de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), daño en el ADN, rutas mitocondriales). Los eventos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos (morfología) y muerte. Los rasgos distintivos de la muerte celular apoptótica incluyen ampollas, exposición de fosfatidilserina sobre la cara extracelular de la membrana plasmática, activación de caspasas, interrupción del potencial de membrana mitocondrial, contracción celular, condensación de cromatina, fragmentación de ADN y condensación de ADN. La unión de un anticuerpo a cierto receptor puede inducir apoptosis.

45 El término "autofagia", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una degradación selectiva de moléculas o estructuras intracelulares, tales como proteínas mal plegadas y orgánulos dañados, y es una función homeostática importante. La autofagia se realiza en concierto con el Sistema de Ubiquitina-Proteasoma (UPS) para degradar las proteínas agregadas/mal plegadas que están ubiquitinadas, etiquetándolas para la degradación por autofagia. La carga ubiquitinada se transporta al fagóforo y rodea su carga formando una vesícula de doble membrana, el autofagosoma. El lisosoma se fusiona con el autofagosoma y la carga se degrada dentro del autolisosoma.

50 El término "necrosis" u "oncosis", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una muerte celular incontrolada caracterizada por hinchazón celular, así como por destrucción de la membrana plasmática y los orgánulos subcelulares, sin fragmentación nuclear ni condensación. La muerte celular necrótica se considera un fenómeno heterogéneo que incluye la muerte celular tanto programada como accidental.

55 El término "proliferación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un aumento en el número de células como resultado del crecimiento celular y la división celular.

60 El término "producto conjugado de anticuerpo-fármaco", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una proteína dimérica de la presente invención, p. ej. un anticuerpo o polipéptido que contiene Fc, que tiene especificidad para al menos un tipo de célula maligna, un fármaco y un conector que acopla el fármaco, p. ej. al anticuerpo. El conector es escindible o no escindible en presencia de la célula maligna; en donde el producto conjugado de anticuerpo-fármaco destruye la célula maligna.

El término "absorción del producto conjugado de anticuerpo-fármaco", como se emplea en la presente memoria, se refiere al procedimiento en el que los productos conjugados de anticuerpo-fármaco se unen a una diana sobre una célula seguido por la absorción/englobamiento por la membrana celular y, por lo tanto, se introduce en la célula. La absorción del producto conjugado de anticuerpo-fármaco se puede evaluar como "internalización mediada por anticuerpos y destrucción celular por ADC anti-TF en un ensayo de destrucción in vitro" como se describe en el documento WO 2011/157741.

Se pretende que el término "FcRn", como se emplea en la presente memoria, haga referencia al receptor de Fc neonatal que es un receptor de Fc. Primero se descubrió en los roedores como un receptor único capaz de transportar la IgG de la leche materna a través del epitelio del intestino del recién nacido en el torrente sanguíneo del recién nacido. Otros estudios revelaron un receptor similar en seres humanos. Sin embargo, en los seres humanos, se encuentra en la placenta para ayudar a facilitar el transporte de la IgG de la madre al feto en crecimiento y también se ha demostrado que juega un papel en el control de la renovación de la IgG. El FcRn se une a la IgG a un pH ácido de 6,0-6,5 pero no a un pH neutro o más alto. Por lo tanto, el FcRn se puede unir a IgG desde la luz intestinal (el interior del intestino) a un pH ligeramente ácido y garantizar un transporte eficaz unidireccional al lado basolateral (dentro del organismo) donde el pH es de neutro a alcalino (pH 7,0-7,5). Este receptor también juega un papel en la recuperación de IgG en adultos a través de su aparición en la ruta de endocitosis en las células endoteliales. Los receptores de FcRn en los endosomas ácidos se unen a la IgG internalizada a través de la pinocitosis, reciclándola a la superficie celular, liberándola al pH alcalino de la sangre, evitando así que sufra degradación lisosómica. Este mecanismo puede proporcionar una explicación para la mayor semivida de la IgG en la sangre en comparación con otros isotipos.

Se pretende que el término "proteína A", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a una proteína de superficie MSCRAMM de 56 kDa encontrada originalmente en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Está codificada por el gen *spa* y su regulación está controlada por la topología del ADN, la osmolaridad celular y un sistema de dos componentes llamado ArIS-ArIR. Se ha encontrado que se puede utilizar en la investigación bioquímica debido a su capacidad para unirse a las inmunoglobulinas. Se compone de cinco dominios de unión a Ig homólogos que se pliegan en un haz de tres hélices. Cada dominio puede unir proteínas de muchas especies de mamíferos, especialmente las IgG. Se une a la región Fc de la cadena pesada de la mayoría de las inmunoglobulinas (solapando el sitio de unión conservado de los receptores FcRn) y también interactúa con la región Fab de la familia VH3 humana. A través de estas interacciones en el suero, las moléculas de IgG se unen a las bacterias a través de su región Fc en lugar de únicamente a través de sus regiones Fab, por lo que la bacteria interrumpe la opsonización, la activación del complemento y la fagocitosis.

Se pretende que el término "proteína G", como se emplea en la presente memoria, haga referencia a una proteína de unión a inmunoglobulina expresada en bacterias estreptocócicas del grupo C y G muy similar a la Proteína A, pero con diferentes especificidades. Es una proteína de superficie celular de 65 kDa (proteína G148 G) y 58 kDa (proteína C40 G) para la que se ha encontrado aplicación en la purificación de anticuerpos a través de su unión a la región Fc.

Proteína dimérica

La presente invención se refiere en un aspecto a una proteína dimérica que comprende un primer y un segundo polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido al menos las regiones C_{H2} y C_{H3} de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en donde al menos uno de los polipéptidos comprende una región de unión que se une específicamente a una diana, en donde en dicho primer y segundo polipéptidos los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son R, G e Y, respectivamente; o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, que está predominantemente en forma oligomérica, en un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 6,8, que está predominantemente en forma monomérica a un pH de menos de 6,0, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración Eu establecida en Kabat.

El primer y segundo polipéptidos de la proteína dimérica según la invención se dimerizan formando una interacción covalente o no covalente. Tal interacción se puede encontrar en cualquier región de los polipéptidos. Los ejemplos de interacción covalente son cualquier interacción peptídica CxxC, en donde la "x" representa cualquier aminoácido y la "C" representa los residuos de cisteína. Otro ejemplo es un dominio constante de cadena TCRalfa y un dominio constante de cadena TCRbeta. Los ejemplos de interacción no covalente pueden ser una cremallera de leucina como describen Moll et al., en Prot. Science, 2001, 10:649-655. En una realización, dichos primer y/o segundo polipéptidos pueden comprender adicionalmente una región susceptible de unión covalente entre dicho primer y segundo polipéptidos.

En una realización, el primer y/o segundo polipéptidos comprenden además una región bisagra.

Para ciertos fines de la presente invención, es suficiente una parte de la región bisagra, tal como las posiciones de

aminoácidos correspondientes a 226-230. Por lo tanto, en una realización, el primer y/o segundo polipéptidos pueden comprender adicionalmente aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 226-230 en una cadena pesada de IgG1 humana.

5 En una realización, el primer y segundo polipéptidos están interconectados mediante enlaces disulfuro de la región bisagra.

A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, las posiciones de aminoácidos mencionadas se refieren a una posición de aminoácidos en una cadena pesada de IgG1 humana en cualquier aspecto o realización de la presente invención.

Además, la numeración de aminoácidos es de acuerdo con la numeración Eu como se expone en Kabat, como se describió anteriormente.

15 En una realización, el aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en Y436, D/E356, T359, E382, N434, Q438, I253 y S254 está, en uno o ambos, tal como cada uno, de dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica,

- (a) I, N, Q, S, T, R, A, E, F, H, K, L, M o V, tal como I, N, Q o S;
- (b) R, G, T, I, L, M, K, H, S, V, Y, Q, N, W, F, A o C;
- (c) R;
- (d) V, L, M, D, Q, K, R, N, H, S, T, W o Y, tal como V, L o M;
- (e) W, H, K, Q, R, D, E, S, T o Y, tal como W, H, K, Q o R;
- (f) N, S, T, A, E, G, H, K, Q, R, W o Y, tal como N, S o T;
- (g) V, L, N, Q, E, S o T, tal como V, L, N o Q;
- (h) L, G, I o V;

para cada posición, respectivamente.

30 En una realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son, para uno o ambos, tales como cada uno, de dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica, R, G e Y, respectivamente.

35 En una realización alternativa, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son, para dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica, K, G e Y, respectivamente.

En una realización alternativa, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son, para dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica, R, S e Y, respectivamente.

40 En una realización alternativa, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son, para dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica, R, G y W, respectivamente.

45 Como se describe en la presente memoria, la presente invención se refiere entre otras, a proteínas diméricas que comprenden aminoácidos en tres posiciones que son diferentes de las presentes naturalmente en la región CH2/CH3 de una cadena pesada de IgG1 humana.

En una realización, dichos primer y segundo polipéptidos de la proteína dimérica están interconectados a través de enlaces disulfuro de la región bisagra.

50 El isotipo del primer y segundo polipéptidos puede ser diferente, pero en una realización particular, son iguales. En una realización, el isotipo del primer y segundo polipéptidos es diferente, por ejemplo, el isotipo de dicho primer polipéptido puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 y el isotipo de dicho segundo polipéptido puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina IgG4. El ejemplo no debe entenderse como limitante y, por lo tanto, otras combinaciones de isotipos se consideran comprendidas en la presente invención.

55 Cualquier posición de aminoácido, o mutación en una posición de aminoácido, descrita en la presente memoria como correspondiente a una posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana, se puede identificar o introducir en su posición equivalente en IgG2, IgG3 e IgG4 como se define por el alineamiento en la Figura 2 para obtener una proteína dimérica según la invención.

60 En una realización particular, el isotipo de la cadena pesada de inmunoglobulina es IgG1.

En una realización adicional, tanto el primer como el segundo polipéptidos comprenden una región de unión, tal como una región de unión a antígeno, que se une específicamente a una diana. La región de unión, tal como una

región de unión a antígeno, del primer y segundo polipéptidos se puede unir a la misma diana, opcionalmente a diferentes epítomos de la misma diana, o se puede unir a diferentes dianas.

Las regiones de unión del primer y/o segundo polipéptidos pueden ser regiones de unión a antígeno.

Dicha región de unión se puede unir a cualquier diana, en donde la diana puede ser, p. ej. una molécula presente sobre una célula, bacteria, parásito o virión.

En una realización particular, la diana puede ser un antígeno.

En una realización adicional, dicho antígeno se puede expresar sobre la superficie de una célula, tal como una célula tumoral humana.

En una realización, dicho antígeno está asociado con una membrana celular.

En otra realización, dicho antígeno está asociado con un virión, opcionalmente en donde el antígeno está comprendido en la cubierta proteica o una envoltura lipídica del virión.

En una realización adicional, la diana al que se une una región de unión puede ser un antígeno expresado sobre la superficie de una célula bacteriana o un virión.

En otra realización, la célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *S. typhimurium*, *Neisseria meningitides*, y *Tuberculosis micobacteriana*.

Los ejemplos de dianas o antígenos incluyen, pero no se limitan a: 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM17; AFP; receptor de células T alfa/beta (TCR); AXL; antígeno de ántrax ANGPT2; anticuerpo anti-fármacos (ADA) BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; antígeno asociado a carcinoma CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD55^{SC1}; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; Claudina4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; CRF-1; Cripto; DLL4; Receptor de muerte 4; Receptor de muerte 5; ED-B; EFNA2; EGFR; Receptor de endotelina B; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP alfa; FAS (aka APO-1, CD95); Fc gamma RI; FCER2; FGFR3; cadena beta de fibrina II; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; glicolípido G-28; GD1a; GD-2; GM-1; gangliósido GD3; GM3; GDF2; GLP1R; Glipicano-3; GPNMB; GRP78; Haemophilus influenza; HBV (virus de hepatitis B); HCMV (citomegalovirus humano); homólogo de la proteína de choque térmico 90 [Candida albicans]; glicoproteína gD de virus herpes simplex; HGF; VIH-1; bucle V3 de gp120 de VIH-1 IIIB; HLA-DRB (HLA-DR beta); anti-anticuerpos humanos humanos (HAHA); anti-anticuerpos murinos humanos (HAMA); virus sincitial respiratorio humano, glicoproteína F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 biespecífico; IgE, IgE Fc; IGF1R; región de conexión de IGHE; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; subunidad beta del receptor de interleucina-2; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; Lewis-x; Lewis-y; lípido A, dominio de lipopolisacárido LPS; LTA; lípido A; Manano (Candida albicans); MET; proteasas microbianas tales como Staphylococcus aureus gluV8 y Streptococcus pyogenes IdeS; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; mielina; antígeno celular de granulocitos NCA-90; Nectina 4; Neisseria meningitides, NGF; proteína de unión al octámero que no contiene dominio POU (NONO); NRP; NY-ESO-1; O-glicano; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; fosfatidilserina; PTK-7; Pseudomonas aeruginosa serotipo IATS O11; RSV (virus sincitial respiratorio humano, glicoproteína F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; subunidad B de la toxina II tipo Shiga [Escherichia coli]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; ácido lipoteicoico de Staphylococcus epidermidis; Streptococcus pneumoniae; TAF-15; receptor de células T alfa_beta; Factor Tisular (TF); TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; Vimentina; erbB1 (EGFR); erbB2 (HER2); erbB3; erbB4; MUC-1; CXCR5; c-Met; envoltura de HERV; periostina; Bigh3; SPARC; BCR; y MRP3.

En una realización adicional, los antígenos se pueden seleccionar entre CD20, EGFr y CD38, opcionalmente, la proteína dimérica de la presente invención se puede seleccionar entre 7D8, 2F8, 003 y 005 como se describe en la presente memoria que comprende las posiciones de aminoácidos definidas por la presente invención. Por lo tanto, 7D8, 2F8, 003 y 005, se pueden utilizar como una proteína dimérica parental de acuerdo con la presente invención.

En una realización, al menos uno de los polipéptidos, de la proteína dimérica, comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención es un anticuerpo.

En una realización adicional, en donde la proteína dimérica es un anticuerpo, uno o ambos, tal como cada uno, del

primer y segundo polipéptidos comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina para formar una primera y una segunda regiones de unión a antígeno, opcionalmente de unión al mismo antígeno

5 En otra realización, en donde la proteína dimérica es un anticuerpo, uno o ambos, tal como cada uno, del primer y segundo polipéptidos comprenden una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina asociada con una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende regiones variables y constantes de cadena ligera para formar una primera y una segunda regiones de unión a antígeno, opcionalmente de unión al mismo antígeno. En tal realización, se entiende que dichos primer y segundo polipéptidos que comprenden regiones variables y constantes de cadena pesada de inmunoglobulina están asociados con una secuencia de cadena ligera de
10 inmunoglobulina que comprende regiones variables y constantes de cadena ligera mediante enlaces disulfuro intercatenarios entre los dominios constantes de dicha cadena pesada y dicha cadena ligera, y formando así una primera y una segunda regiones de unión a antígeno, opcionalmente de unión uniéndose al mismo antígeno.

15 En una realización adicional, en donde la proteína dimérica es un anticuerpo, uno o ambos polipéptidos comprenden una región constante de cadena pesada de longitud completa, tal como una región constante de cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa.

20 Las regiones CH2 y CH3 del primer y/o segundo polipéptidos pueden, excepto por las posiciones de aminoácidos definidas por la presente invención, comprender los aminoácidos 114-223 y 224-330, respectivamente, de SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 111-219 y 220-326, respectivamente, de SEQ ID NO: 2; los aminoácidos 161-270 y 271-377, respectivamente, de SEQ ID NO: 3; los aminoácidos 111-220 y 221-327, respectivamente, de SEQ ID NO: 4; o los aminoácidos 114-223 y 224-330, respectivamente, de SEQ ID NO: 5.

25 Dichos primer y/o segundo polipéptidos pueden comprender adicionalmente una región bisagra, en donde dicha región bisagra comprende los aminoácidos 99-113 de SEQ ID NO: 1; los aminoácidos 99-110 de SEQ ID NO: 2; los aminoácidos 99-160 de SEQ ID NO: 3; los aminoácidos 99-110 de SEQ ID NO: 4; o los aminoácidos 99-113 de SEQ ID NO: 5.

30 El primer y/o segundo polipéptidos pueden, excepto por las posiciones de aminoácidos definidas por la presente invención, comprender una secuencia de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5.

35 La proteína dimérica de la presente invención puede ser, en una realización particular como se describe anteriormente, un anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos pueden hacer referencia de ese modo a "un anticuerpo de la presente invención" o "un anticuerpo variante", y un "anticuerpo parental".

Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada de anticuerpos monovalentes, que consisten solo en dos cadenas pesadas y que aparecen de forma natural, p. ej., en camélidos (p. ej. Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446); ThioMabs (Roche, documento WO2011069104), dominio modificado genéticamente de intercambio de hebra (SEED or Seed-body) que son moléculas de tipo anticuerpo asimétricas y biespecíficas (Merck, documento WO2007110205); Triomab (Fresenius, Lindhofer et al. (1995) J Immunol 155:219); FcΔAdp (Regeneron, documento WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, documento WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, documento WO2011/028952), Inmunoglobulina de dominio variable doble (Abbott, DVD-Ig, Patente de Estados Unidos Núm. 7.612.181); Anticuerpos de doble cabeza de dominio doble (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), Di-diacuerpo (ImClone/Eli Lilly), formatos de anticuerpos de Botones en ojales (Genentech, documento WO9850431); DuoBody (Genmab, documento WO 2011/131746); Formatos de anticuerpos orientados por interacción electrostática (Amgen, documentos EP1870459 y WO 2009089004; Chugai documento US201000155133; Oncomed, documento WO 2010129304A2); IgG1 e IgG2 biespecíficas (Rinat Neurosciences Corporation, documento WO11143545), CrossMAbs (Roche, documento WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus), Anticuerpos de dominio de direccionamiento doble (GSK/Domantis), Anticuerpos dos en uno que reconocen dos dianas (Genentech, NovImmune), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), CovX-body (CovX/Pfizer), biespecíficos similares a IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J. et al., J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): pág. 65-74), y DIG-body y PIG-body (Pharmabcine), y moléculas de redireccionamiento de afinidad doble (Fc-DART o Ig-DART, de MacroGenics, documentos WO/2008/157379, WO/2010/080538), Zybodies (Zyngenia), enfoques con cadena ligera común (Crucell/Merus, documento US7262028) o cadenas pesadas comunes (κλBodies de NovImmune), así como proteínas de fusión que comprenden una secuencia de polipéptidos fusionada a un fragmento de anticuerpo que contiene fusiones scFv de tipo dominio Fc, como BsAb de ZymoGenetics/BMS), HERCULES de Biogen Idec (documento US007951918), SCORPIONS de Emergent BioSolutions/Trubion, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N. et al., J Mol Biol, 2009. 393(3): pág. 672-92), fusiones de scFv de Novartis, fusiones de scFv de Changzhou Adam Biotech Inc (documento CN 102250246), TvAb de Roche (documentos WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² de f-Star (documento WO2008/003116), y fusiones de scFv dobles, un mini-anticuerpo y un anticuerpo Ig de doble direccionamiento (DT). También se debe entender que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (tales como anticuerpos monoclonales humanos), mezclas de anticuerpos (policlonales recombinantes), por ejemplo, generados por tecnologías explotadas

por Symphogen y Merus (Oligoclónicos), y polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede potencialmente poseer cualquier isotipo.

El anticuerpo parental o un anticuerpo de la presente invención se pueden preparar a partir de anticuerpos de tipo salvaje o formatos de anticuerpos no naturales como cualquiera de los descritos en la presente memoria, p. ej., proteínas heterodiméricas, que se utilizan como material de partida en el que se introducen las modificaciones relevantes según la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir, p. ej., mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o se pueden producir por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, por Clackson et al., en *Nature* 352, 624628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581 597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno sobre la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de hibridomas derivadas de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados tales como conejos, ratas, perros, primates, etc.

El anticuerpo puede ser, p. ej., un anticuerpo quimérico o humanizado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden generar utilizando ratones transgénicos o trans cromosómicos, p. ej., ratones HuMAb, que transportan partes procedentes del sistema inmunitario humano en lugar de procedentes del sistema inmunitario de ratón. El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ humanas no reorganizadas, junto con mutaciones elegidas como diana que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856 859 (1994)). Por consiguiente, los ratones exhiben una reducción de la expresión de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado por Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65 93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764 536 546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb es descrita en detalle por Taylor, L. et al., en *Nucleic Acids Research* 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647 656 (1993), Tuaille et al., *J. Immunol.* 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845 851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Adicionalmente, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies se pueden identificar a través de tecnologías de tipo de presentación, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica, presentación en mamíferos, presentación en levadura y otros mecanismos conocidos en la técnica, y las moléculas resultantes se pueden someterse a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica.

El anticuerpo no está limitado a anticuerpos que tienen un dominio Fc natural, p. ej., humano, pero también puede ser un anticuerpo que tenga otras mutaciones que las de la presente invención, tales como p. ej. mutaciones que afectan a la glicosilación, la unión a C1q, la unión al receptor de Fc o permiten que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico. Por el término "anticuerpo natural" se entiende cualquier anticuerpo que no comprende ninguna mutación introducida genéticamente. Un anticuerpo que comprende variaciones naturales, p. ej., diferentes alotipos, por lo tanto, se debe entender como un "anticuerpo natural" en el sentido de la presente invención. Tales anticuerpos pueden servir como molde o material de partida, p. ej., anticuerpo parental, para introducir las mutaciones de acuerdo con la presente invención, y de ese modo proporcionar los anticuerpos de la invención. Un ejemplo de un anticuerpo que comprende mutaciones diferentes de las de la presente invención es un anticuerpo biespecífico como se describe en el documento WO2011/131746 (Genmab), que utiliza condiciones reductoras para promover el intercambio de la mitad de la molécula de dos anticuerpos que comprenden regiones CH3 emparejadas similares a IgG4, formando así anticuerpos biespecíficos sin formación concomitante de agregados. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos biespecíficos tales como biespecíficos heterodiméricos: Triomabs (Fresenius); IgG1 e IgG2 biespecíficos (Rinat Neurosciences Corporation); Fc Δ Adp (Regeneron); Botones en ojales (Genentech); Orientación por interacción electrostática (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbodies (Merck); Azymetric Scaffold (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); y LUZ-Y (Genentech). Otros formatos de anticuerpos ilustrativos incluyen, sin limitación, un anticuerpo de tipo salvaje, un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo que contiene Fc, un anticuerpo humano o cualquier combinación de los mismos.

Se pueden producir anticuerpos monoclonales para su uso en la presente invención, p. ej., mediante el método del

5 hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o se puede producir mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, por Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno sobre la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados tales como ratas, perros, primates, etc.

10 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra cualquier antígeno se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes procedentes del sistema inmunitario humano en lugar de procedentes del sistema de ratón. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente memoria como ratones HuMAb® y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos".

15 El ratón HuMAb® contiene un miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reorganizadas, junto con mutaciones elegidas como diana que inactivan los loci de cadena γ y κ endógenas (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones exhiben una reducción de la expresión de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994) supra revisado por Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb® es descrita en detalle por Taylor, L. et al., en *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaille et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

20 Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (como describen Chen et al., en *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una interrupción de CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424) y un transgén de cadena ligera κ humana KCo5 (como describen Fishwild et al., en *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Adicionalmente, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan los transgenes de la cadena pesada y ligera κ de inmunoglobulina humana en un fondo homocigoto para la interrupción de los loci de la cadena pesada y ligera κ de ratón endógenos.

25 En la cepa de ratón KM, el gen de la cadena ligera κ de ratón endógeno se ha alterado homocigóticamente como describen Chen et al., en *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen de la cadena pesada de ratón endógeno se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de cadena ligera κ humana, KCo5, como describen Fishwild et al., en *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento de cromosoma 14 hCF (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/C se pueden generar cruzando HCo12 con KCo5 [J/K] (Balb) como se describe en el documento WO/2009/097006. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

30 Adicionalmente, cualquier región de unión a antígeno se puede obtener a partir de anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies identificadas a través de tecnologías de tipo presentación, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otros mecanismos, utilizando mecanismos bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes y Plutchau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), ParmLey y Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al.,

Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992) y documento US 5.733.743) Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos se pueden humanizar.

5 La proteína dimérica, p. ej., el anticuerpo de la presente invención puede comprender la cadena pesada de IgG1 humana que comprende, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de SEQ ID NO: 1 (número de acceso UniProt No. P01857), que comprende por ejemplo el segmento relevante, 1253 a K447, p. ej., P247 a K447, correspondiente a los residuos subrayados 136 a 330, p. ej., 130 a 330, de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana; SEQ ID NO: 1:

10

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicvnhkps ntkvdkkvpe
 101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvdvs
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrdeltnqvsltc
 251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv lsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

15 El alotipo de la IgG1 mencionada anteriormente es IgG1m(za). El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 en SEQ ID NO: 1 son para la presente invención los aminoácidos 1-98, 99-113, 114-223 y 224-330, respectivamente. El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 cuando se numeran de acuerdo con la numeración Eu como se expone en Kabat se numeran como aminoácidos 118-215, 216-230, 231-340 y 340-447, respectivamente.

20 La proteína dimérica, p. ej., el anticuerpo de la presente invención también puede comprender una cadena pesada de IgG2 humana que comprende, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de SEQ ID NO: 2. Los residuos de aminoácido 1253 a K447, p. ej., P247 a K447, de la cadena pesada de IgG1 corresponden a los residuos subrayados 132 a 326, p. ej., 126 a 326, de la región constante de la cadena pesada de IgG2 (número de acceso P01859; SEQ ID NO: 2)

25

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdkhps ntkvdktver
 101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpcvtc vvvdvshedp
 151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vsvltvvhq dwlngkeykc
 201 kvsnkqlpap iektisktkg qprepqvvtl ppsreemtkn qvsltclvkg
 251 fypsdiavew esngqpenny kttppmldsd gsfflysklt vdkswqqgn
 301 vfscsvmhea lhnhytqksl slspgk

30 El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 en SEQ ID NO: 2 son para la presente invención los aminoácidos 1-98, 99-110, 111-219 y 220-326, respectivamente.

35 La proteína dimérica, p. ej., el anticuerpo de la presente invención también puede comprender una cadena pesada de IgG3 humana que comprende, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de SEQ ID NO: 3. Los residuos de aminoácido 1253 a K447, p. ej., P247 a K447, de la cadena pesada de IgG1 corresponden a los residuos 183 a 377, p. ej., 177 a 377, de la región constante de la cadena pesada de IgG3 (número de acceso UniProt P01860, SEQ ID NO: 3), subrayada a continuación:

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv

51 htfpavlqss glylssvvt vpssslgtqt ytcvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktplgdttht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
 201 pevqfkwyvd gvevhnaktk preeqynstf rvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkalpa piektisktk gqprepvyt lppsreemtk nqvsltclvk
 301 gfypsdiave wessgqpenn ynttppmls dgsfflyskl tvdksrwqqg
 351 nifscsvmhe alhnrtqks lslspgk

El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 en SEQ ID NO: 3 son para la presente invención los aminoácidos 1-98, 99-160, 161-270 y 271-377, respectivamente.

5 La proteína dimérica, p. ej., el anticuerpo de la presente invención también puede comprender una cadena pesada de IgG4 humana que comprende, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de SEQ ID NO: 4. Los residuos de aminoácido 1253 a K447, p. ej., P247 a K447, de la cadena pesada de IgG1 corresponden a los residuos subrayados 133 a 327, p. ej., 127 a 327, de la región constante de la cadena pesada de
 10 IgG4 (número de acceso P01859, SEQ ID NO: 4)

1 astkgpsvfp lapcsrste staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glylssvvt vpssslgtkt ytcvndhkps ntkvdkrves
 101 kygpccpscp afeffggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed
 151 pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty rvsvltvlh qdwlngkeyk
 201 ckvsnkqlps siektiskak gqprepvyt lppsqeemtk nqvsltclvk
 251 gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlis dgsfflysl tvdksrwqeg
 301 nvfscsvmhe alhnhytqks lslslgk

El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 en SEQ ID NO: 4 son para la presente invención los aminoácidos 1-98, 99-110, 111-220 y 221-327, respectivamente.

15 La proteína dimérica, p. ej., el anticuerpo de la presente invención también puede comprender una cadena pesada de alotipo IgG1m(f) humano que comprende, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de SEQ ID NO: 5. Los residuos de aminoácido 1253 a K447 de la cadena pesada del alotipo IgG1m(f) corresponden a los residuos subrayados 136-330 de SEQ ID NO:5

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glylssvvt vpssslgtqt yicvnhkps ntkvdkrvep
 101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmsrtpevtcvvvdvs
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree mtknqvslt
 251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qqgnvfscsv mhealthnht qkslslspgk

25 El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 en SEQ ID NO: 5 son para la presente invención los aminoácidos 1-98, 99-113, 114-223 y 224-330, respectivamente.

30 La proteína dimérica de la presente invención puede ser de otro alotipo de inmunoglobulinas IgG1 humanas, tales como IgG1m(a), IgG1m(z) e IgG1m(x). Se ha descrito que dichos alotipos contienen diferentes aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 214, 356, 358 y 431 según la numeración Eu como se expone en Kabat.

35 En la Figura 2 se muestra un alineamiento de los segmentos respectivos de las regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG1m(f), IgA1, IgA2, IgE, IgD e IgM. En consecuencia, cualquier posición de aminoácido o mutación en una posición de aminoácido, descrita en la presente memoria como correspondiente a una posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana, se puede identificar o introducir en su posición equivalente en IgG2, IgG3, IgG4 e, IgG1m(f) según lo definido por el alineamiento de la Figura 2 para obtener una proteína dimérica según la

invención.

En una realización, el anticuerpo es un completo anticuerpo humano, tal como un anticuerpo IgG1 completo humano.

5 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano, p. ej., el alotipo IgG1m(za) o IgG1m(f), en donde opcionalmente el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos comprenden, excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria, SEQ ID NO: 1 o 5. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que puede ser cualquiera de los alotipos conocidos dentro de ese isotipo.

10 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2 humano.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3 humano.

15 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 humano.

En realizaciones particulares de cualquier proteína dimérica de la presente invención, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica, comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con los aminoácidos P247 a K447, p. ej., 1253 a K447, de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5 de al menos 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o de al menos aproximadamente 99%, excepto por las posiciones de aminoácidos definidas por la presente invención.

20 Por lo tanto, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica pueden comprender una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 excepto por cualquier residuo de aminoácido de la presente invención y definido en la presente memoria.

25 Los autores de la presente invención han encontrado que seis anticuerpos en los que los aminoácidos E, E y S en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 de una cadena pesada de IgG1 humana, han sido sustituidos por los aminoácidos R, G e Y, respectivamente, son capaces de formar estructuras hexaméricas no covalentes en solución.

30 Por lo tanto, la proteína dimérica de la presente invención está predominantemente en forma oligomérica, tal como forma hexamérica, en un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 6,8.

35 Por lo tanto, en una realización, una proteína dimérica de la presente invención es capaz de formar una estructura hexamérica no covalente en las condiciones descritas en los Ejemplos 20 o 23, p. ej., en una solución de fosfato de sodio 12,6 mM, NaCl 140 mM a pH 7,4, o en una solución de Na₂SO₄ 0,1 M, fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,8, o en una solución de NaCl 0,15 M, tampón de citrato 0,1 M a pH 6,8. En el contexto de la presente invención, el término "capaz de formar una estructura hexamérica no covalente" significa que más de 30%, tal como más de 40%, o más de 50%, o más de 60%, o más de 70% , o más de 80%, o más de 85%, o más de 90%, o más de 95% de las proteínas diméricas, p. ej., anticuerpos están en una estructura hexamérica no covalente cuando se determina como se describe en el Ejemplo 20. En una realización adicional, la proteína dimérica de la presente invención no es capaz de formar una estructura no covalente en una solución de NaCl 0,15 M, tampón de citrato 0,1 M a pH 5.0. El término "no es capaz de formar una estructura hexamérica no covalente" significa en el contexto de la presente invención que menos de 10%, tal como menos de 8%, o menos de 7%, o menos de 6%, o menos de 5%, o menos de 4%, o menos de 3%, o menos de 2%, o menos de 1%, o menos de 0,5% de las proteínas diméricas, p. ej., anticuerpos, están en una estructura hexamérica no covalente cuando se determina como se describe en el Ejemplo 20. Por lo tanto, en una realización, la estructura hexamérica se puede determinar realizando fraccionamiento mediante HP-SEC (cromatografía de exclusión por tamaño a alta presión) utilizando una resina de cromatografía de exclusión por tamaño adecuada con un tamaño de poro capaz de separar moléculas en el intervalo de 50 kDa a 1000 kDa, conectado a un detector de absorbancia; separando muestras de 50 µL que contienen 1,25 µg/mL de proteína a 1 mL/min en Na₂SO₄ 0,1 M/fosfato de sodio 0,1 M tamponado a pH 6,8; utilizando el soporte lógico adecuado para procesar los resultados; y expresando por pico como porcentaje del área del pico total.

55 La capacidad de una proteína dimérica de la presente invención de formar una estructura oligomérica, p. ej., hexamérica, hace que la proteína dimérica sea adecuada para unir dianas no solo presentes en una célula sino también dianas solubles. Por lo tanto, la proteína dimérica de la presente invención se puede utilizar, p. ej., para eliminar factores solubles, p. ej., toxinas bacterianas u otros factores no deseados del torrente sanguíneo, tales como los componentes del complemento, p. ej., C1q.

60 La fenotipificación de los eritrocitos, tal como la determinación del estado Rhesus D, es importante en el caso de transfusiones de sangre y para determinar el riesgo de enfermedad hemolítica de un recién nacido. Para la fenotipificación de los eritrocitos, actualmente se utilizan anticuerpos monoclonales IgG humanos en una prueba de

laboratorio, p. ej., prueba de Coombs. Sin embargo, muchas de las IgG utilizadas en estos ensayos inducen una escasa aglutinación. En lugar de IgG, se pueden utilizar estructuras oligoméricas, p. ej., estructuras hexaméricas, de las proteínas diméricas de la presente invención como reactivos en ensayos de fenotipificación. La utilización de una estructura oligomérica, tal como una estructura hexamérica, estable, de las proteínas diméricas de la presente invención para la fenotipificación de eritrocitos podría tener varias ventajas, tales como que la estructura oligomérica podría inducir por sí misma el entrecruzamiento de las células sin necesidad de un anticuerpo secundario, podría mejorar la sensibilidad del ensayo, y se podrían utilizar dos o más proteínas diméricas que tuvieran diferentes regiones de unión para la fenotipificación de múltiples antígenos de eritrocitos simultáneamente. Por lo tanto, en una realización, la proteína dimérica de la presente invención se puede utilizar para la fenotipificación de eritrocitos. En una realización, se pueden utilizar dos o más, tal como tres, cuatro, cinco o seis, proteínas diméricas de la presente invención que tienen diferentes regiones de unión para la fenotipificación de múltiples antígenos de eritrocitos.

En una realización adicional, la proteína dimérica de la presente invención tiene una mayor función efectora en comparación con una proteína dimérica parental. La proteína dimérica de la presente invención se puede considerar como una variante de una proteína dimérica parental en donde la variante comprende mutaciones de aminoácidos en las posiciones 345, 430 y 440, en comparación con la proteína dimérica parental. Una proteína dimérica parental es en este contexto una proteína dimérica en la que los aminoácidos de dichos primer y/o segundo polipéptidos corresponden a los de una cadena pesada de IgG1 humana en las posiciones E345, E430 y S440, en donde la posición de aminoácidos S440 corresponde a aquellos de una cadena pesada de IgG1 humana en esa posición. Como se describió anteriormente, la proteína dimérica parental puede ser de cualquier isotipo.

Para un anticuerpo, típicamente, la eficacia del anticuerpo se puede expresar por el valor de CE50, que es la concentración del anticuerpo necesaria para obtener el 50% del efecto máximo. Esto se aplica de manera similar a una proteína dimérica de la presente invención.

El efecto máximo es el efecto obtenido cuando se emplea una cantidad saturante del anticuerpo, en el que la saturación se refiere a la cantidad de anticuerpo a la que todos los antígenos para el anticuerpo están unidos por el anticuerpo. Esto se aplica de manera similar a una proteína dimérica de la presente invención.

El término "aumentar una función efectora" o "mejorar una función efectora" se refiere en el contexto de la presente invención a una disminución en el valor de CE50 de la proteína dimérica de la presente invención en comparación con la proteína dimérica parental. La disminución en el valor de CE50 puede, p. ej., ser de al menos o aproximadamente 2 veces, tal como al menos o aproximadamente 3 veces, o al menos o aproximadamente 5 veces, o al menos o aproximadamente 10 veces. Alternativamente, "aumentar una función efectora" o "mejorar una función efectora" significa que hay un aumento en la cantidad máxima de células lisadas (donde la cantidad total de células se establece en 100%) p. ej., de 10% a 100% de todas las células, tal como aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% y aproximadamente 100% en condiciones en las que la proteína dimérica parental lisa menos de 100% de todas las células.

Una proteína dimérica se podría someter a prueba para determinar el incremento o mejora de la función efectora clonando el dominio variable de la cadena pesada de IgG1-005 o IgG1-7D8 en la proteína dimérica y someter a prueba su eficacia en ensayos de CDC, como se describe para Daudi (Ejemplo 3) y Wien (Ejemplo 6). En una realización, la eficacia de la CDC se puede determinar preincubando las células en suspensión a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de 96 pocillos de fondo redondo con un anticuerpo en el intervalo de 0,0003 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente, añadiendo suero humano normal a una concentración de 20%, 30% o 50% de la concentración final, incubando a 37°C durante 45 minutos, colocando las placas sobre hielo, añadiendo 10 μL de yoduro de propidio y determinando la lisis celular mediante análisis FACS.

Utilizando un dominio variable HC de IgG1-7D8 y células Daudi, un aumento se definiría por una CE50 más de 2 veces menor que la CE50 de IgG1-7D8 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor 10 veces más bajo de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Usando un dominio variable HC de IgG1-005 y células Daudi, un aumento se definiría por una CE50 más de 2 veces menor que la CE50 de IgG1-005 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor 10 veces más bajo de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Usando un dominio variable HC IgG1-7D8 y células Wien133, un aumento se definiría por una CE50 más de 2 veces menor que la CE50 de IgG1-7D8 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor 10 veces más bajo de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable HC de IgG1-005 y células Wien133, un aumento se definiría por un aumento en la lisis máxima que varía de 10% a 100% de todas las células, tal como aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente

80%, aproximadamente 90% y aproximadamente 100%. Un aumento en la eficacia de la CDC también podría definirse por una CE50 más de 2 veces menor que la CE50 de IgG1-005 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor 10 veces más bajo de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima en condiciones en las que la lisis de las células Wien133 es detectable.

Los autores de la presente invención han encontrado que un anticuerpo en donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana no son E, E y S, respectivamente, tienen un valor de CE50 más bajo para unirse a C1q y un menor valor de CE50 para CDC (véase el ejemplo 21) en comparación con el mismo anticuerpo en donde los aminoácidos en dichas posiciones son E, E y S, respectivamente.

En una realización adicional, se puede incrementar una función efectora, tal como CDC, de la proteína dimérica de la presente invención cuando la proteína dimérica se une a su diana sobre una célula o virión donde la diana está presente sobre el virión o la membrana celular, en comparación con la proteína dimérica parental.

Otras posiciones de aminoácidos

El primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica de la presente invención pueden comprender adicionalmente otros aminoácidos específicos en la posición o posiciones indicadas. Como se describe en la presente memoria, una proteína dimérica de la presente invención, p. ej., un anticuerpo, se puede preparar introduciendo mutaciones en las posiciones de aminoácidos como se especifica mediante la presente invención.

Los ejemplos de tales otras posiciones de aminoácidos adicionales, o mutaciones, incluyen posiciones de aminoácidos en las que el aminoácido específico afecta a una o más funciones efectoras de la proteína dimérica. Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen residuos de aminoácido que son capaces de mejorar la CDC, la unión a C1q, la unión al receptor de Fc-gamma o la unión a FcRn y/o mejorar las funciones efectoras mediadas por el receptor Fc-gamma.

Los ejemplos de funciones efectoras incluyen (i) unión a C1q, (ii) activación del complemento, (iii) CDC, (iv) formación de oligómero, (v) estabilidad del oligómero, (vi) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), (vii) unión a FcRn, (viii) unión a receptor de Fc-gamma, (ix) fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), (x) citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), (xi) citotoxicidad potenciada por complemento, (xii) unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado mediado por el anticuerpo, (xiii) internalización, (xiv) modulación por disminución, (xv) inducción de apoptosis, (xvi) opsonización, (xvii) modulación de la proliferación, tal como reducción, inhibición y estimulación de la proliferación, y (xviii) una combinación de cualquiera de (i) a (xvi), de una proteína dimérica, tal como un anticuerpo cuando p. ej. está unido a su antígeno sobre una célula, sobre una membrana celular, sobre un virión o sobre otra partícula.

En una realización, una proteína dimérica según la invención comprende adicionalmente un residuo de aminoácido, o una modificación de un residuo de aminoácido, que se conoce por potenciar la CDC, p. ej., un intercambio de segmentos entre los isotipos de IgG para generar moléculas de IgG quiméricas (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72); una o más sustituciones de aminoácidos en la región bisagra (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138), y/o una o más sustituciones de aminoácidos en o cerca del sitio de unión a C1q en el dominio CH2, centrado alrededor de los residuos D270, K322, P329 y P331 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564; documento WO 99/51642; Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189). Por ejemplo, en una realización, una proteína dimérica según la invención comprende adicionalmente una combinación de cualquiera de las sustituciones de aminoácidos S267E, H268F, S324T, S239D, G236A e I332E, que proporciona una mejora de la función efectora a través de CDC o ADCC (Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189 y documento WO 2011/091078 A2). También se pueden utilizar otras mutaciones de Fc que afectan a la unión a los receptores de Fc (descritas en los documentos WO 2006/105062, WO 00/42072, Patente de Estados Unidos Núm. 6.737.056 y Patente de Estados Unidos Núm. 7.083.784) o a las propiedades físicas de los anticuerpos (descritas en el documento WO 2007/005612 A1) en las variantes de la invención.

Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en al menos una posición correspondiente a S267, H268, S324, S239, G236 y I332, puede ser E, F, T, D, A y E, respectivamente.

En una realización, una proteína dimérica según la invención comprende adicionalmente modificaciones que mejoran la unión al receptor de Fc-gamma y/o la función efectora mediada por el receptor de Fc-gamma. Tales modificaciones incluyen (i) reducir la cantidad de fucosa en la glicosilación anclada a CH2 (glicoingeniería) (Umana P, et al., Nat Biotechnol 1999; 17:176-80; Niwa R, et al., Clin Cancer Res 2004; 10:6248-55), y (ii) mutagénesis dirigida al sitio de aminoácidos en las regiones bisagra o CH2 de los anticuerpos (modificación genética de proteínas) (Lazar GA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:4005-10).

- 5 En otra realización, tales mutaciones adicionales pueden ser mutaciones que inhiben o reducen las funciones efectoras de la proteína dimérica. En aplicaciones clínicas en las que no se requiere el compromiso del sistema inmunitario e incluso se pueden causar efectos secundarios no deseados, el primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica se pueden mutar a continuación adicionalmente en el dominio CH2 para abolir las interacciones de C1q y/o el receptor de FcGamma.
- 10 Se han identificado algunos residuos de aminoácido en el dominio Fc que juegan un papel dominante en las interacciones con C1q y los receptores de FcGamma. Se demostró que las posiciones 234 y 235 tienen un fuerte efecto de modulación sobre la unión de Fc humano a CD64 humano (Canfield y Morrison, 1991; Chappel et al., 1991; Hezareh et al., 2001), CD32A (Hezareh et al., 2001; Armor et al., 2003), CD16 (Hezareh et al., 2001) y C1q (Xu et al., 2000; Hezareh et al., 2001). Se demostró que la posición 331 de CH2 es un determinante principal para la unión de IgG humana a CD64 humano (Canfield y Morrison, 1991, *J Exp Med.*; 173:1483-91) y C1q (Tao et al., 1993; Idusogie et al., 2000) y una mutación triple L234F/L235E/P331S causa una disminución profunda en la unión a CD64, CD32A, CD16 y C1q humanos.
- 15 En base a este conocimiento, se describieron varias variantes para hacer que el dominio Fc sea inactivo para las interacciones con los receptores de Fcgamma y C1q para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos.
- 20 Para IgG1, se describieron L234A y L235A y P331S mutantes (Hezareh M, et al., *J Virol* 2001, 75:12161-12168, Xu D et al., *Cell Immunol* 2000, 200:16-26, Shields RL et al., *J Biol Chem* 2001, 276:6591-6604) y se utilizó L234A combinado con L235A en medicina clínica (Herold KC, et al. *Diabetes* 2005, 54:1763-1769). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en al menos una posición correspondiente a L234, L235 y P331, puede ser A, A y S, respectivamente.
- 25 También se describió la mutación de estas mismas posiciones a L234F y L235E para dar como resultado dominios Fc con interacciones anuladas con los receptores de FcGamma y C1q (Oganesyan *Acta Cryst.* (2008) D64, 700-704, Canfield y Morrison, 1991 *J Exp Med.*; 173:1483-91., Duncan, 1988 *Nature* 332:738-40). Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235, pueden ser F y E, respectivamente.
- 30 La mutación de la posición D265A mostró una disminución de la unión a todos los receptores de Fcγ e impidió la ADCC (Shields RL et al., *J Biol Chem* 2001, 276:6591-6604). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a D265, puede ser A.
- 35 La unión a C1q podría ser anulada mutando las posiciones D270, K322, P329 y P331 (Idusogie et al., *J Immunol* 2000, 164:4178-4184). La mutación de estas posiciones a D270A o K322A o P329A o P331A hizo que el anticuerpo tuviera una actividad CDC deficiente. Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en al menos una posición correspondiente a D270, K322, P329 y P331, pueden ser A, A, A y A, respectivamente.
- 40 Un enfoque alternativo para minimizar la interacción del dominio Fc con los receptores de Fcgamma y C1q es mediante la eliminación del sitio de glicosilación de un anticuerpo. La mutación de la posición N297 a, por ejemplo, Q, A y E elimina un sitio de glicosilación que es crítico para las interacciones del receptor de Fcgamma de IgG (Tao y Morrison, *J Immunol.* 15 de octubre de 1989; 143(8): 2595-601, Bolt S et al., *Eur J Immunol* 1993, 23:403-411). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a N297, puede ser Q, A o E.
- 45 Alternativamente, las subclases IgG2 e IgG4 humanas se ven naturalmente comprometidas en sus interacciones con C1q y los receptores de Fcgamma. Sin embargo, se han descrito interacciones residuales con los receptores de Fcγ (receptores de Fcgamma) (Parren et al., *J Clin Invest* 1992, 90:1537-1546.). Se han descrito mutaciones que anulan estas interacciones residuales para ambos isotipos y dan como resultado una reducción de los efectos secundarios no deseados asociados con la unión a FcR. Para IgG2, se describió la mutación de L234A y G237A (Cole MS et al., *J Immunol* 1997, 159:3613-3621 y para IgG4 se describió L235E (Reddy MP et al., *J Immunol* 2000, 164:1925-1933). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L234 y G237 en una cadena pesada de IgG2 humana, puede ser A y A, respectivamente. En una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L235 en una cadena pesada de IgG4 humana, puede ser E.
- 50
- 55 Otros enfoques para minimizar adicionalmente la interacción con los anticuerpos IgG2 para los receptores de Fcgamma y C1q se describieron en el documento WO 2011/066501 A1 (PCT/US2010/058188) y Lightle, S. et al.; *Protein Science* (19):753-62 (2010).
- 60 Alternativamente, la región bisagra del anticuerpo es importante con respecto a las interacciones con los receptores de Fcgamma y el complemento. Se ha descrito que las mutaciones en la región bisagra influyen en las funciones efectoras de un anticuerpo (Brekke et al., *J Immunol* 2006, 177:1129-1138, Dall'Acqua WF, et al., *J Immunol* 2006, 177:1129-1138. La mutación o delección de la región bisagra afectará a las funciones efectoras de Fc de un anticuerpo.

Por lo tanto, en una realización, el primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica de la presente invención pueden comprender adicionalmente cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente que inhiben o reducen una o más funciones efectoras de la proteína dimérica.

5 La combinación de conjuntos de mutaciones descritas anteriormente puede dar como resultado un dominio Fc aún más inerte, por ejemplo, combinando las mutaciones L234F, L235E, D265A; o L234F, L235E, N297Q y D265A en un dominio Fc de IgG1 u otras variaciones generadas por la información descrita anteriormente. Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en al menos una o una combinación de posiciones correspondientes a L234, L235, D265; o L234, L235, N297 y D265, pueden ser F, E, A, F, E, Q y A, respectivamente.

10 En una realización, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos de la proteína dimérica de la presente invención pueden comprender adicionalmente cualquier combinación de las mutaciones mencionadas anteriormente que inhiben o reducen una o más funciones efectoras de la proteína dimérica.

15 Típicamente, el efecto de un anticuerpo sobre una función efectora se puede medir por el valor de CE50, que es la concentración del anticuerpo necesaria para obtener la mitad del valor de la lisis máxima. Esto se aplica de manera similar a una proteína dimérica de la presente invención.

20 La lisis máxima es el efecto obtenido cuando se emplea una cantidad saturante del anticuerpo en la que la saturación se refiere a la cantidad de anticuerpo a la que todos los antígenos para el anticuerpo están unidos al anticuerpo. Esto se aplica de manera similar a una proteína dimérica de la presente invención.

25 Por lo tanto, en una realización, el primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica pueden comprender adicionalmente sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, que son F, E y A, respectivamente.

30 El término "disminución de una función efectora" se refiere en el contexto de la presente invención a que hay un aumento en el valor de CE50 de la proteína dimérica en comparación con la proteína dimérica parental, en donde la proteína dimérica parental tiene el significado descrito anteriormente. El aumento del valor de CE50 puede, p. ej., ser al menos o aproximadamente 2 veces, tal como al menos o aproximadamente 3 veces, o al menos o aproximadamente 5 veces, o al menos o aproximadamente 10 veces. Alternativamente, "disminución de una función efectora" significa que hay una disminución de la cantidad máxima de células lisadas p. ej. de 10% a 100% de todas las células, tal como aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% y aproximadamente 100% en condiciones en las que la proteína dimérica parental lisa menos de 100% de todas las células.

35 Una proteína dimérica se podría someter a prueba para determinar la disminución de función efectora clonando el dominio variable de la cadena pesada de IgG1-005 o IgG1-7D8 en la proteína dimérica y someter a prueba su eficacia en ensayos de CDC, tales como los descritos para Daudi (Ejemplo 3) y Wien (Ejemplo 6). Utilizando un dominio variable de HC IgG1-7D8 y células Daudi, una disminución se definiría por una CE50 más de 2 veces mayor que la CE50 de IgG1-7D8 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor más de 10 veces mayor de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable de HC de IgG1-005 y células Daudi, una disminución se definiría por una CE50 más de 2 veces mayor que la CE50 de IgG1-005 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor más de 10 veces mayor de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable HC de IgG1-7D8 y células Wien133, una disminución se definiría por una CE50 más de 2 veces mayor que la CE50 de IgG1-7D8 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor más de 10 veces mayor de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable HC de IgG1-005 y células Wien133, una disminución se definiría por una disminución en la lisis máxima que oscila entre 10% y 100% de todas las células, tal como aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% y aproximadamente 100%. Una disminución en la eficacia de la CDC también podría definirse por una CE50 más de 2 veces mayor que la CE50 de IgG1-005 en las condiciones estudiadas, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor más de 10 veces mayor de CE50, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima en condiciones en las que la lisis de las células Wien133 es detectable.

60 FcRn es un receptor relacionado con el complejo de histocompatibilidad de clase I y desempeña un papel en el suministro pasivo de inmunoglobulinas (IgG) de la madre a la cría y en la regulación de los niveles de IgG en suero al proteger la IgG de la degradación intracelular (Ghetie V et al., Annu Rev Immunol. 18, 739-66 (2000)). Como FcRn es responsable de la persistencia prolongada de IgG y otras proteínas conjugadas con Fc en el suero, la modulación

de la interacción FcRn-Fc permitirá el control deliberado de la semivida de estos agentes en la circulación para diversos fines.

5 En una realización, la proteína dimérica puede comprender otros residuos de aminoácido o adicionales, tales como sustituciones de aminoácidos, que afectan al perfil farmacocinético, p. ej., al afectar a la unión a FcRn.

10 En una realización, el aclaramiento plasmático de formas hexaméricas de proteínas diméricas según la presente invención se reduce, por ejemplo, para permitir una dosificación más baja y minimizar las reacciones adversas causadas por dosis altas, disminuir la frecuencia de inyección, maximizar la transcitosis a sitios de tejido específicos, mejorar la eficacia de suministro transplacentaria, o disminuir los costes de producción.

15 En una realización adicional, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica según la presente invención, se han modificado adicionalmente, p. ej., en la región CH2 y/o CH3, por ejemplo, para mejorar el perfil farmacocinético, p. ej., mediante la mejora de la unión a FcRn, p. ej., a pH 6,0. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones en una o más cualesquiera de las posiciones de aminoácidos P238, T250, M252, 1253, S254, R255, T256, D265, E272, N286, K288, V303, V305, T307, L309, H310, Q311, D312, K317, K340, D356, K360, Q362, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, S400, D413, S415, S424, M428, H433, N434, H435, Y436, K439 o K447 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de EU como en Kabat (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001), Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002), Hinton, P. et al., J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004), Dall'Acqua, W.F., et al, J Biol Chem. 33, 23514-24 (2006), Petkova, S.B., et al, Int Immunol. 12, 1759-69 (2006), Datta-Mannan, A., et al., J Biol Chem. 3, 1709-17 (2007), Yeung, Y.A., J Immunol. 12, 7663-71 (2009), Kabat, E.A. en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH Núm. 91-3242, 5ª edición 662, 680, 689 (1991)).

25 En otra realización adicional, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica según la presente invención, se han modificado adicionalmente para mejorar el perfil farmacocinético, mediante la mejora de la unión a FcRn mediante las mutaciones específicas N434A (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001)), T307A/E380A/N434A (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001)), T250Q/M428L (Hinton, P. et al., J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004)) o M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002)), en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat (Kabat, EA en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH Núm. 91-3242, 5ª edición 662, 680, 689 (1991)). Por lo tanto, en una realización, un aminoácido en la posición correspondiente a N434 puede ser A. En otra realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a T307, E380 y N434 pueden ser A, A y A, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones T250 y M428 pueden ser Q y L, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a M252, S254 y T256 pueden ser Y, T y E, respectivamente.

40 En una realización, la proteína dimérica puede comprender una sustitución de uno o más de P238, T256, T307, Q311, D312, E380, E382 y N434 en un residuo de alanina que mejora la unión a FcRn (Shields RL et al., J. Biol. Chem 2001; 276:6591); o una sustitución de aminoácidos o una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, H433R/N434Y/Y436H, M252Y/S254T/T256E-H433K/N434F/Y436H o M252Y/S254T/T256EG385R/Q386T/P387R/N389P en un IgG1 incrementando la afinidad por FcRn (Dall'Acqua et al., más arriba). Por lo tanto, en una realización, uno o más aminoácidos en las posiciones correspondiente a las posiciones seleccionados del grupo que consiste en P238, T256, T307, Q311, D312, E380, E382 y N434 pueden ser, para cada polipéptido de la proteína dimérica, una A para cada posición, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos en una posición correspondiente a M252, S254 y T256, pueden ser Y, T y E, respectivamente; o en la posición correspondiente a M252 puede ser W; o en una posición correspondiente a M252 puede ser Y; o en posiciones correspondientes a M252 y T256 pueden ser Y y Q, respectivamente; o en posiciones correspondientes a M252 y T256 pueden ser F y D, respectivamente; o en posiciones correspondientes a V308, L309 y Q311 pueden ser T, P y S, respectivamente; o en posiciones correspondientes a G385, Q386 y N389 pueden ser D, P y S, respectivamente; o en posiciones correspondientes a G385, Q386, P387 y N389 pueden ser R, T, R y P, respectivamente; o en posiciones correspondientes a H433, N434 e Y436 pueden ser K, F y H, respectivamente; o en posiciones correspondientes a N434 e Y436 pueden ser F y H, respectivamente; o en posiciones correspondientes a H433, N434 e Y436 pueden ser R, Y y H, respectivamente; o en posiciones correspondientes a M252, S254, T256, H433, N434 e Y436 pueden ser Y, T, E, K, F y H, respectivamente; o en posiciones correspondientes a M252, S254, T256, G385, Q386, P387 y N389 pueden ser Y, T, E, R, T, R y P, respectivamente.

60 En una realización, la semivida de las formas hexaméricas de las proteínas diméricas de acuerdo con la presente invención se acorta, por ejemplo, para garantizar el aclaramiento rápido de las proteínas diméricas utilizadas para la generación de imágenes y/o la radioinmunoterapia, o promover la eliminación de las moléculas diana patógenas.

En una realización adicional, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica

según la presente invención, se han modificado adicionalmente, p. ej., en la región CH2 y/o CH3, por ejemplo, para modular el perfil farmacocinético, p. ej., mediante la reducción o anulación de la unión a FcRn. Estas modificaciones incluyen, sin limitarse a, mutaciones en una o más cualesquiera de las posiciones de aminoácidos P238, T250, M252, I253, S254, R255, T256, D265, E272, N286, K288, V303, V305, T307, L309, H310, Q311, D312, K317, K340, D356, K360, Q362, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, S400, D413, S415, S424, M428, H433, N434, H435, Y436, K439 o K447 la región Fc, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat (Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001), Dall'Acqua, W.F., et al, J Immunol. 9, 5171-80 (2002), Hinton, P. et al., J Biol Chem. 8, 6213-6 (2004), Dall'Acqua, W.F., et al, J Biol Chem. 33, 23514-24 (2006), Petkova, S.B., et al, Int Immunol. 12, 1759-69 (2006), Datta-Mannan, A., et al., J Biol Chem. 3, 1709-17 (2007), Yeung, Y.A., J Immunol. 12, 7663-71 (2009), Kabat, E.A. en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH Núm. 91-3242, 5ª edición 662, 680, 689 (1991)). En otra realización adicional, el primer y/o segundo polipéptidos, p. ej., ambos polipéptidos, de la proteína dimérica según la presente invención, se han modificado adicionalmente para mejorar el perfil farmacocinético, reduciendo o anulando la unión a FcRn por las mutaciones específicas I253A, H310A, H433A, H435A, Y436A, mutaciones I253A/H310A/H435A (Kim, J. K. et al., EUR. J. Immunol. 29, 2819-2825 (1999), Shields, R.L., et al, J Biol Chem. 9, 6591-604 (2001)), en donde la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat (Kabat, EA en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH Núm. 91-3242, 5ª edición 662, 680, 689 (1991)). Por lo tanto, en una realización, un aminoácido en al menos una posición correspondiente a una posición seleccionada del grupo que consiste en I253, H310, H433, H435 e Y436, puede ser A para cada posición, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a I253, H310A y H435A pueden ser cada uno A.

Otro ejemplo de otras posiciones de aminoácidos donde el aminoácido específico puede ser relevante, p. ej., donde una proteína dimérica parental está mutada para cambiar el aminoácido, pueden ser aminoácidos que afectan la interacción en la región Fc entre proteínas diméricas, p. ej., anticuerpos. Tales mutaciones se pueden utilizar para minimizar la interacción de una proteína dimérica terapéutica, p. ej., anticuerpo terapéutico, con anticuerpos presentes de forma natural en un paciente al que se administra la proteína dimérica terapéutica, p. ej., anticuerpo terapéutico.

Tales residuos de aminoácido o mutaciones se han descrito previamente en PCT/EP12/063339 e incluyen combinaciones de dos residuos de aminoácido o mutaciones que disminuyen individualmente una función efectora pero cuando se utilizan juntos, p. ej., combinando dos proteínas diméricas, cada una de las cuales comprende uno de dichos residuos de aminoácido o mutaciones, la función efectora es similar a una proteína dimérica parental en la que dicho residuo de aminoácido no está mutado, por lo tanto, corresponde a la de una cadena pesada de IgG1 humana. Cuando tales dos proteínas diméricas, cada una de las cuales comprende uno de tales pares de mutaciones, se utilizan juntas, la especificidad para la interacción entre dichas dos proteínas diméricas se puede aumentar en comparación con la interacción entre dos proteínas diméricas que comprenden solo una de las mutaciones de dicho par de mutaciones. De manera similar, la interacción entre dos proteínas diméricas, cada una de las cuales comprende uno de tales pares de mutaciones, también puede ser más fuerte que la interacción entre una proteína dimérica que comprende solo una de las mutaciones de dicho par con una proteína dimérica que no comprende ninguna de las mutaciones del par.

Por tanto, en una realización, el primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica de la presente invención puede comprender adicionalmente una mutación o un residuo de aminoácido de acuerdo con este aspecto.

De ese modo, sin limitarse a ninguna teoría, se prevé que al incluir tales dos mutaciones en una proteína dimérica terapéutica, la inducción de la unión de C1q en un paciente se limitará a complejos oligoméricos que contienen proteína dimérica terapéutica, p. ej., anticuerpos, que comprenden tal combinación o par de aminoácidos. Esto puede permitir una reducción de cualquier efecto secundario potencial causado por la interacción de la proteína dimérica terapéutica con los anticuerpos propios del paciente que no comprenden tales mutaciones.

En una realización concreta, se puede utilizar una proteína dimérica combinada con otra proteína dimérica, en donde cada una de las proteínas diméricas comprende uno de los aminoácidos de tal "par" de aminoácidos. De ese modo, en una realización, la presente invención se refiere a una proteína dimérica que comprende uno de los aminoácidos de tal "par" en el primer y/o segundo polipéptidos. Tal proteína dimérica, p. ej., la primera proteína dimérica, que comprende un aminoácido de tal "par" se puede utilizar junto con una segunda proteína dimérica que comprende en el primer y/o segundo polipéptidos el otro aminoácido de tal "par". Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen los de la Tabla 1. Por lo tanto, en una realización adicional, un aminoácido en una posición correspondiente a K439, S440, K447, 448 y 449 puede ser, para cada polipéptido de la proteína dimérica de la presente invención, como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

Posición de aminoácidos (IgG1)	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
K439	439DER	439E
S440	440DEKR	440K
K447	447De	447E
K447 /448	447KRH/448P	447/448P
K447	447De	447E
K447/448 /449	447KRH/448KRH/449P	447/448K/449P

Las combinaciones específicas de proteína dimérica que comprenden tales aminoácidos pueden ser como se describe en la presente memoria.

5 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la presente invención, el aminoácido en la posición correspondiente a K439 es, para uno o ambos, por ejemplo, para cada uno, polipéptidos de la proteína dimérica, distinto de K.

10 En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K439 es E o D.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K439 es E.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K439 es D.

15 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, K439 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R; G; E; e Y, respectivamente.

20 En otra realización, el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a K447 es, para uno o ambos, por ejemplo, para cada uno, polipéptidos de la proteína dimérica D o E.

En una realización adicional, el aminoácido en una posición correspondiente a K447 es D.

En una realización adicional, el aminoácido en una posición correspondiente a K447 es E.

25 En otra realización, el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a K447 es, para uno o ambos, por ejemplo, para cada uno, de los polipéptidos de la proteína dimérica, K, R o H y los polipéptidos comprenden

(a) un residuo de aminoácido en la posición 448 que es P; o

30 (b) un residuo de aminoácido en la posición 448 que es K, R o H y un residuo de aminoácido en la posición 449 que es P.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 es K.

35 En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 es R.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 es H.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a 448 es K.

40 En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a 448 es R.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a 448 es H.

45 En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a Q386 es, para uno o ambos, por ejemplo, para cada uno, de los polipéptidos de la proteína dimérica, K.

50 Como se describe en los Ejemplos 3-5, las variantes de anticuerpos que comprenden solo una de las mutaciones K439E y S440K tuvieron un aumento drástico de K_D para C1q, lo que refleja una disminución de la activación del complemento y/o la capacidad de la CDC. Sorprendentemente, se encontró que las variantes de anticuerpos de HuMAb 7D8 o 005 que comprendían ambas mutaciones tenían una unión a C1q o una CDC aumentadas o restauradas. Sin estar limitado por ninguna teoría específica, el mecanismo subyacente podría explicarse quizás por las mutaciones respectivas que se compensan estéricamente entre sí, como se ilustra en la Figura 4.

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención es un homodímero. Por lo tanto, en una realización, tanto el primer como el segundo polipéptidos de la proteína dimérica comprenden las mismas o idénticas sustituciones de aminoácidos de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención.

5 **Formato heterodimérico**

En otra realización, la proteína dimérica de la presente invención es un heterodímero.

10 Al menos uno de los polipéptidos comprende una región de unión que se une específicamente a una diana. En una realización adicional, cada polipéptido de la proteína heterodimérica comprende una región de unión que se une específicamente a una diana objetivo, opcionalmente la misma diana.

La diana puede ser cualquiera de las descritas en la presente memoria.

15 En una realización adicional, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de la proteína heterodimérica se pueden unir a diferentes epítomos sobre la misma diana. En otra realización, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de la proteína heterodimérica se pueden unir a diferentes dianas.

20 En otra realización, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de la proteína heterodimérica se pueden unir a diferentes dianas sobre diferentes células.

En una realización particular, la proteína heterodimérica puede ser un anticuerpo biespecífico.

25 En una realización adicional, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de dicho anticuerpo heterodimérico se pueden unir a diferentes epítomos sobre la misma diana. En otra realización, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de dicho anticuerpo heterodimérico se pueden unir a diferentes dianas.

30 En otra realización, las regiones de unión del primer y segundo polipéptidos de la proteína heterodimérica se pueden unir a diferentes dianas sobre diferentes células.

Si la proteína dimérica es una proteína heterodimérica, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, en una realización pueden ser diferentes en el primer y segundo polipéptidos, sin embargo, también pueden en otra realización ser iguales.

35 Dichos aminoácidos pueden ser diferentes, por ejemplo, si la proteína heterodimérica se produce como se describe en el documento WO2011/131746.

El anticuerpo biespecífico de la presente invención no está limitado a un formato particular y puede ser cualquiera de los descritos en la presente memoria.

40 Las moléculas de anticuerpos biespecíficas ilustrativas que se pueden utilizar en la presente invención comprenden (i) un único anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno, (ii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para dos epítomos diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem por un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig),
45 donde cada cadena ligera y cadena pesada contienen dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) un fragmento (Fab')₂ biespecífico conectado químicamente; (v) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana;
50 (vi) un flexibody, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (viii) una molécula denominada Scorpion, que comprende, p. ej., dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cossbody o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado de brazo Fab (tal como se describe en el documento WO 11/131746) como los descritos en la presente invención.

60 Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a

- moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización
- moléculas de doble direccionamiento similares a IgG recombinante, en donde los dos lados de la molécula

- contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes;
- moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos IgG completos se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes del fragmento Fab;
- 5 • moléculas de fusión de Fc, en donde las moléculas de Fv de cadena sencilla o los diacuerpos se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones de Fc o partes de los mismos;
- moléculas de fusión de Fab, en donde diferentes fragmentos Fab se fusionan entre sí, se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos;
- 10 • anticuerpos basados en ScFv y diacuerpos y de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej. anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o con otra proteína o molécula portadora fusionada con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos.

15 Los ejemplos de moléculas similares a IgG con moléculas con dominios CH3 complementarios incluyen, pero no se limitan a, Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Botones en Ojales (Genentech), CrossMAbs (Roche) y anticuerpos electrostáticamente emparejados (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody)(EMD Serono), Biclomics (Merus), FcΔAdp (Regeneron), IgG1 e IgG2 biespecíficos (Pfizer/Rinat), Azymetric Scaffold (Zymeworks), mAb-Fv (Xencor), biespecificos bivalentes (Roche) y DuoBody (Genmab A/S).

20 Los ejemplos de moléculas de doble direccionamiento similares a IgG recombinantes incluyen, pero no se limitan a, Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis), Two in one Antibody (Genentech), Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb² (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

25 Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, pero no se limitan a, Ig de dominio variable doble (DVD) (Abbott), biespecífico similar a IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

30 Los ejemplos de moléculas de fusión de Fc incluyen, pero no se limitan a, Fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergen BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) y Dual(ScFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China).

35 Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen, pero no se limitan a F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action or Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

40 Los ejemplos de anticuerpos basados en ScFv, diacuerpos y de dominio incluyen, pero no se limitan a, Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) and COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de direccionamiento doble (Ablynx), anticuerpos de un solo dominio de cadena pesada de direccionamiento doble.

En una realización particular, el anticuerpo biespecífico tiene el formato descrito en documento WO 2011/131746.

45 Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a una proteína heterodimérica según la presente invención, en donde

50 el aminoácido en una posición seleccionada entre K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 no es K, T, L, K, D, F e Y, respectivamente, en el primer polipéptido, y el aminoácido en una posición seleccionada entre F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 no es F, T, L, K, D, Y y K, respectivamente, en el segundo polipéptido.

55 En una realización particular de la proteína heterodimérica, el aminoácido en la posición K409 es R en el primer polipéptido, y el aminoácido en la posición F405 es L en el segundo polipéptido.

60 Por consiguiente, en una realización, las secuencias de dicho primer y segundo polipéptidos contienen residuos de aminoácido asimétricos o mutaciones, es decir residuos de aminoácido o mutaciones en diferentes posiciones en el primer y segundo polipéptidos, p. ej. un aminoácido o mutación específicos en la posición 405 en uno de los polipéptidos y un aminoácido o mutación específicos en la posición 409 en el otro polipéptido. La referencia al primer y segundo polipéptidos a este respecto no se debe entender como limitante, ya que los residuos de aminoácidos o las mutaciones pueden estar presentes de manera similar en el polipéptido opuesto. Por lo tanto, p. ej., el aminoácido en la posición F405 es L en dicho primer polipéptido, y el aminoácido en la posición K409 es R en dicho segundo polipéptido; o viceversa, el aminoácido en la posición K409 es R en dicho primer polipéptido, y el

aminoácido en la posición F405 es L en dicho segundo polipéptido.

- 5 En una realización, el primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, tal como Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407, en donde dicho aminoácido no es T, L, K, D, F e Y. En una de tales realizaciones, dicho primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405, p. ej., Lys, Leu, Met, Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Tyr, Trp o Cys. En una realización adicional del presente documento, dicho primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, en la posición 409 y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly, p. ej. Lys, Leu, Met, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Pro, Ala, Val, Ile, Tyr, Trp o Cys, en la posición 405.
- 10
- 15 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido comprende un aminoácido distinto de Phe, p. ej., Lys, Leu, Met, Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Tyr, Trp o Cys, en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del presente documento, dicho primer polipéptido comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej. Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405, p. ej., Lys, Leu, Met, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Pro, Ala, Val, Ile, Tyr, Trp o Cys, y una Lys en la posición 409.
- 20
- 25 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del presente documento, dicho primer polipéptido comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly, p. ej., Lys, Leu, Met, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Pro, Ala, Val, Ile, Tyr, Trp o Cys, en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En otra realización, dicho primero el polipéptido comprende Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 30
- 35 En una realización adicional, dicho primer polipéptido comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En una realización adicional, dicho primer polipéptido comprende una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 40
- 45 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 50 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 55 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 60 En otra realización, dicho primer polipéptido comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- En otra realización, dicho primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407, p. ej., His, Asn, Gly, Pro,

Ala, Val, Ile, Trp, Leu, Met o Cys. En otra realización, dicho primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407.

5 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en posición 407.

10 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407, p. ej., His, Asn, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Trp, Leu, Met o Cys, y una Lys en la posición 409.

15 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

20 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y dicho segundo polipéptido tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en posición 407 y una Lys en la posición 409.

25 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407, p. ej. His, Asn, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Trp, Leu, Met o Cys y una Lys en la posición 409.

30 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

35 En otra realización, dicho primer polipéptido tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicho segundo polipéptido tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En una realización, el primer polipéptido tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp o Cys, y el segundo polipéptido tiene

- (i) un aminoácido distinto de Phe, Leu y Met en la posición 368, p. ej., Arg, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Lys, Tyr, Trp o Cys o
- (ii) un Trp en la posición 370, o
- (iii) un aminoácido distinto de Asp, Cys, Pro, Glu o Gln en la posición 399, p. ej., Arg, His, Ser, Thr, Asn, Gly, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Leu o Met, o
- (iv) un aminoácido distinto de Lys, Arg, Ser, Thr o Trp en la posición 366, p. ej., Leu, Met, His, Asp, Glu, Asn, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr o Cys.

45 En una realización, el primer polipéptido tiene una Arg, Ala, His o Gly en la posición 409, y el segundo polipéptido tiene

- (i) una Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o
- (ii) un Trp en la posición 370, o
- (iii) una Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399 o
- (iv) una Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met o Tyr en la posición 366.

En una realización, el primer polipéptido tiene una Arg en la posición 409, y el segundo polipéptido tiene

- (i) una Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o
- (ii) un Trp en la posición 370, o
- (iii) una Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399, o
- (iv) una Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln en la posición 366.

60 Además de las sustituciones de aminoácidos especificadas anteriormente, dicho primer y segundo polipéptidos pueden contener sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a las secuencias de Fc de tipo salvaje.

Tales anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención se pueden generar como se describe en el Ejemplo 8.

Además, el efecto sobre la destrucción por CDC por las proteínas heterodiméricas generadas puede probarse utilizando un ensayo como el utilizado en el Ejemplo 9. Por lo tanto, en una realización particular, la destrucción por CDC se puede determinar preincubando las células en suspensión a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de 96 pocillos de fondo redondo con un anticuerpo en el intervalo de 0,0003 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente, añadiendo suero humano normal a una concentración final de 20%, 30% o 50%, incubando a 37°C durante 45 minutos, poniendo las placas sobre hielo, añadiendo 10 μL de yoduro de propidio y determinando la lisis celular mediante análisis FACS.

En una realización particular adicional de la proteína heterodimérica, el aminoácido en una posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido, y el aminoácido en una posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido, o viceversa; y en donde los aminoácidos del primer y segundo polipéptidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son R, G e Y, respectivamente.

En una realización particular adicional de la proteína heterodimérica, el aminoácido en una posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido, y el aminoácido en una posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido, o viceversa; y en donde los aminoácidos del primer y/o segundo polipéptidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son K, G e Y, respectivamente.

En una realización particular adicional de la proteína heterodimérica, el aminoácido en una posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido, y el aminoácido en una posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido, o viceversa; y en donde los aminoácidos del primer y/o segundo polipéptidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son R, S e Y, respectivamente.

En una realización particular adicional de la proteína heterodimérica, el aminoácido en una posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido, y el aminoácido en una posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido, o viceversa; y en donde los aminoácidos del primer y/o segundo polipéptidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son R, G y W, respectivamente.

En una realización adicional, cualquier otro aminoácido en la proteína heterodimérica puede ser como se describe adicionalmente en la sección "Otras posiciones de aminoácidos".

El Ejemplo 11 muestra que la introducción de la mutación E345R en un anticuerpo biespecífico CD20xEGFR aumenta la eficacia de la CDC. Por lo tanto, en una realización, la eficacia de la CDC se puede determinar preincubando las células en suspensión de una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de 96 pocillos de fondo redondo con un anticuerpo a una concentración final que varía de 0,0003 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente, añadiendo suero humano normal a una concentración final de 20%, 30% o 50%, incubando a 37°C durante 45 minutos, poniendo las placas sobre hielo, añadiendo 10 μL de yoduro de propidio y determinando la lisis celular mediante análisis FACS.

Los ejemplos 9, 15 y 16 también describen algunos de los diferentes anticuerpos biespecíficos.

El anticuerpo biespecífico puede, por ejemplo, comprender una región de unión a antígeno de un anticuerpo contra CD20 y una región de unión a antígeno de un anticuerpo contra CD38, y los aminoácidos según la presente invención. Las regiones de unión a CD20 ilustrativas incluyen las de ofatumumab (2F2), 7D8 y 11B8, descritas en el documento WO2004/035607 y rituximab (documento WO 2005/103081). Las regiones de unión a CD38 ilustrativas incluyen las de 003 y daratumumab (005), descritas en documento WO2006/099875.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se une a diferentes epítopos sobre la misma diana o sobre una diferente. Por lo tanto, la región de unión del primer y segundo polipéptidos puede unirse en una realización a la misma diana, pero a diferentes epítopos. En otra realización, la región de unión del primer y segundo polipéptidos se puede unir a diferentes dianas.

En otra realización, la región de unión del primer y segundo polipéptidos se puede unir a diferentes dianas sobre diferentes células.

En una realización adicional, uno o más aminoácidos adicionales pueden ser como se describe en la presente memoria. En una realización particular, el aminoácido en una posición correspondiente a K439 es D o E, en cada uno de los polipéptidos de la proteína heterodimérica.

60 **Proteínas de fusión de Fc**

En un aspecto de la presente invención, la proteína dimérica de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la invención es parte de una proteína de fusión. Una proteína de fusión puede referirse a una proteína que consiste en dos o más fragmentos de proteína conectados covalentemente que no se expresan naturalmente como una proteína

única. Las proteínas de fusión se pueden producir, p. ej., mediante tecnologías de clonación y expresión recombinantes comúnmente conocidas en la técnica, o el método de creación de proteínas de fusión puede ser posterior a la producción. Los ejemplos de tales procedimientos son inteína, proteína ligasa u otros procedimientos enzimáticos comúnmente conocidos en la técnica. Por lo tanto, se entiende que una proteína de fusión es dicha proteína dimérica que comprende un primer y un segundo polipéptidos, cada uno de los cuales comprende al menos una región CH2 y CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina, en donde dichos primer y/o segundo polipéptidos comprenden adicionalmente una región de unión.

Por lo tanto, el primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica según la invención comprenden adicionalmente una región de unión. Se entiende que una región de unión es una secuencia de polipéptidos que es capaz de unirse a una diana. Por lo tanto, la región de unión puede ser una proteína, ligando de proteína, receptor, una región de unión a antígeno o una región de unión a ligando capaz de unirse a una diana asociada con una célula, bacteria, virión o similar. Una región de unión puede, por ejemplo, comprender parte de un receptor, ligando del receptor, ligando, citocina, hormona o región de unión a antígeno de una inmunoglobulina o anticuerpo.

En una realización, la región de unión es una citocina que se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α .

En una realización, la región de unión es una región de unión a antígeno. En algunas realizaciones, dichos primer y/o segundo polipéptidos de dicha proteína dimérica comprenden, además de la región Fc, una o más o todas las demás regiones de un anticuerpo, es decir, una región CH1, una región VH, una región CL y/o una región VL. Por lo tanto, en una realización, dicho primer polipéptido es un anticuerpo completo. En otra realización, dicho segundo polipéptido es un anticuerpo completo.

En otra realización, la región de unión es una toxina, tal como una toxina natural.

Productos Conjugados

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención, comprende adicionalmente un fármaco, toxina, radiomarca, agente radioopaco, agente paramagnético, agente fluorescente, agente fosforescente, agente potenciador de ultrasonidos, sialilación o polietilenglicol (PEG), opcionalmente conjugado con al menos uno de los polipéptidos a través de un conector.

En una realización, dicha proteína dimérica es parte de una proteína de fusión.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende una radiomarca.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un agente radioopaco.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un agente paramagnético.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un agente fluorescente.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un agente fosforescente.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un agente potenciador de ultrasonidos.

En una realización, la proteína dimérica de la invención comprende un polietilenglicol (PEG).

En otra realización, la proteína dimérica de la invención no se conjuga en el extremo C con otra molécula, tal como una toxina o marca. En una realización, la proteína dimérica se conjuga con otra molécula en otro sitio, típicamente en un sitio que no interfiere en la formación de oligómeros. Por ejemplo, la proteína dimérica puede, en el otro sitio, estar unida a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una toxina (incluido un radioisótopo), un profármaco o un fármaco. Tal compuesto puede hacer que la destrucción de las células diana sea más eficaz, p. ej., en la terapia contra el cáncer. La proteína dimérica resultante es, por lo tanto, un producto inmunoconjugado.

Por lo tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona una proteína dimérica, tal como un anticuerpo conectado a, o conjugado con, uno o más radicales terapéuticos, tales como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor y/o un radioisótopo. Tales productos conjugados se denominan en la presente memoria "productos inmunoconjugados" o "productos conjugados de fármacos". Los productos inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial (p. ej., destruya) células. Los agentes

terapéuticos adecuados para formar productos inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracenediona o maitansina o un análogo o derivado o de la misma, antibióticos antitumorales de enodieno que incluyen neocarzinostatina, caliqueamicinas, esperamicinas, dinemicinas, lidamicina, kedarcidina o análogos o derivados de los mismos, antraciclinas, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descarbazina, hidroxiaurea, asparraginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbrazina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (también conocido como raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), dolastatina, pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PDB) o análogos de los mismos, antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), agentes antimitóticos (p. ej., inhibidores de tubulina) tales como monometil auristatina E, monometil auristatina F u otros análogos o derivados de dolastatina 10; Inhibidores de histona desacetilasa, como los ácidos hidroxámicos tricostatina A, vorinostat (SAHA), belinostat, LAQ824 y panobinostat, así como las benzamidas, entinostat, CI994, mocetinostat y compuestos de ácido alifático como fenilbutirato y ácido valproico, inhibidores de proteasoma, tales como Danoprevir, bortezomib, amatoxinas tales como alfa-amantina, toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de difteria y sus fragmentos activos y moléculas híbridas); toxina ricina (tal como la ricina A o una toxina de la cadena A de la ricina desglucosilada), toxina del cólera, una toxina tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen péptidos antimicrobianos/lífticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18; ribonucleasa (RNasa), ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, toxina diftérica y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan et al., *Cell* 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. *Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos que se pueden administrar combinados con una proteína dimérica de la presente invención como se describe en otra parte de la presente memoria, tales como, p. ej., citocinas o quimiocinas anticancerosas, también son candidatos para radicales terapéuticos útiles para la conjugación con una proteína dimérica de la presente invención.

En una realización, los productos conjugados de fármacos de la presente invención comprenden una proteína dimérica como se describe en la presente memoria conjugada con auristatinas o análogos y derivados de péptidos de auristatina (documentos US5635483; US5780588). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren en la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (documento US5663149) y actividad antifúngica (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42:2961-2965. El radical del fármaco auristatina se puede anclar a la proteína dimérica a través de un conector, a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxi) del radical del fármaco peptídico.

Las realizaciones ilustrativas de auristatina incluyen los radicales de fármaco monometil auristatina conectados al extremo N DE y DF, descritos por Senter et al., en *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. Volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en el documento US 2005/0238649).

Una realización de auristatina ilustrativa es MMAE (monometil auristatina E). Otra realización de auristatina ilustrativa es MMAF (monometil auristatina F).

En una realización, una proteína dimérica de la presente invención comprende un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácido nucleico. En una de tales realizaciones, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula inhibitoria de ARN (p. ej., una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulador (p. ej., una molécula de ADN inmunoestimuladora que contiene el motivo CpG). En otra realización, una proteína dimérica de la presente invención se conjuga con un aptámero o una ribozima.

En una realización, se proporcionan proteínas diméricas que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Se puede utilizar una proteína dimérica radiomarcada tanto para fines de diagnóstico como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de marcas para polipéptidos incluyen 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc y 125I, 131I y 186Re. Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados de péptidos relacionados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Junghans et al., en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y documentos U.S. 4.681.581; U.S. 4.735.210; U.S. 5.101.827; U.S. 5.102.990 (US RE35.500), U.S. 5.648.471 y U.S.

5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo se puede conjugar por el método de la cloramina-T.

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención se conjuga con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, la proteína dimérica se puede conjugar con un conector quelante, p. ej. DOTA, DTPA o tiuxetano, que permite que la proteína dimérica forme complejo con un radioisótopo. La proteína dimérica puede comprender o estar conjugada, también o alternativamente con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Se puede utilizar una proteína dimérica radiomarcada con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. En una realización, la proteína dimérica de la presente invención se conjuga con un emisor alfa. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bs , ^{225}Ac y ^{227}Th .

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención se puede conjugar con una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α .

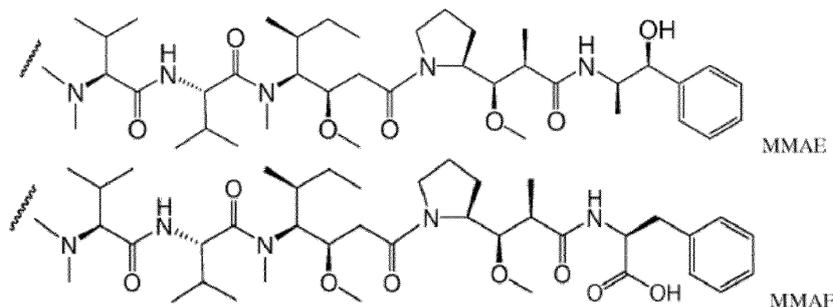
Las proteínas diméricas de la presente invención también se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Los polímeros ilustrativos y métodos para anclarlos a péptidos se ilustran, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106; US 4.179.337; US 4.495.285 y US 4.609.546. Los polímeros adicionales incluyen polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000).

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar la proteína dimérica de la presente invención con la molécula o las moléculas conjugadas, tales como las descritas anteriormente, incluidos los métodos descritos por Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962), David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain et al., *J. Immunol. Met.* 40, 219 (1981) y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). Tales proteínas diméricas se pueden producir conjugando químicamente el otro radical con el lado N-terminal o el lado C-terminal de la proteína dimérica o fragmento de la misma (p. ej., una cadena H o L de un anticuerpo) (véase, p. ej., *Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Tales derivados de proteínas diméricas conjugadas también se pueden generar mediante conjugación en residuos internos o azúcares, cuando sea apropiado.

Los agentes se pueden acoplar directa o indirectamente a una proteína dimérica de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento a través de un radical espaciador o conector a residuos de cisteína o lisina en un anticuerpo biespecífico. En una realización, una proteína dimérica se conjuga con una molécula de profármaco que se puede activar *in vivo* a un fármaco terapéutico a través de un espaciador o conector. En algunas realizaciones, el conector es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del conector libera la unidad de fármaco de la proteína dimérica al entorno intracelular. En algunas realizaciones, el conector es escindible por un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). Por ejemplo, los espaciadores o conectores pueden ser escindidos por enzimas asociadas a células tumorales u otras condiciones específicas de tumores, por las cuales se forma el fármaco activo. Los ejemplos de tales tecnologías de profármacos y conectores se describen en los documentos WO2083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2007089149, WO2009017394 y WO201062171 de Syntarga BV, et al. La tecnología adecuada de profármacos de anticuerpos y análogos de duocarmicina también se pueden encontrar en Patente de Estados Unidos Núm. 6.989.452 (Medarex). El conector puede ser también o alternativamente, p. ej. un conector de peptidilo que es escindido por una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector de peptidilo tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos que dan como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). En una realización específica, el conector de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit (valina-citrulina) o un conector Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase p. ej. el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector Val-Cit y diferentes ejemplos de conectores Phe-Lys). Los ejemplos de las estructuras de un conector Val-Cit y Phe-Lys incluyen, entre otros, MC-vc-PAB descritos a continuación, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB o MC-Phe-Lys-GABA, en donde MC es una abreviatura de maleimido caproilo, vc es una abreviatura de Val-Cit, PAB es una abreviatura de carbamato de *p*-aminobencilo y GABA es una abreviatura de ácido γ -aminobutírico. Una ventaja de utilizar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y las estabilidades séricas de los productos conjugados son típicamente altas.

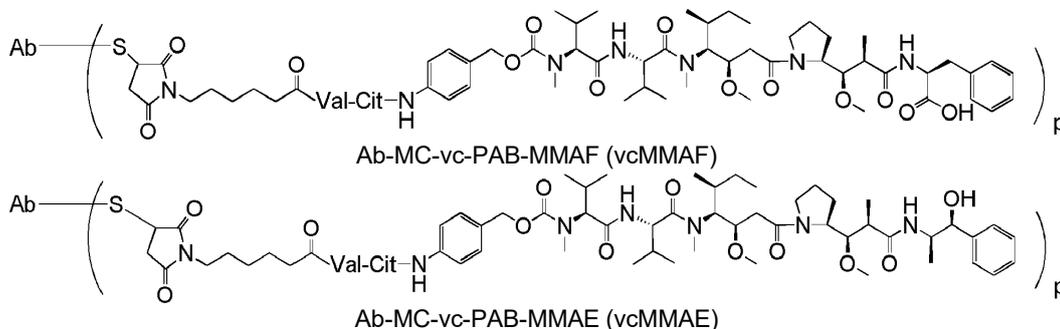
En otra realización más, la unidad de conector no es escindible y el fármaco se libera por degradación de proteínas o anticuerpos diméricos (véase el documento US 2005/0238649). Típicamente, tal conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se emplea en la presente memoria, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular" en el contexto de un conector significa que no más de 20%, típicamente no más de aproximadamente

15%, más típicamente no más de 10% aproximadamente, y aún más típicamente no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los conectores, en una muestra de compuesto conjugado de fármaco y proteína dimérica, se escinde cuando el compuesto conjugado de fármaco y proteína dimérica está presente en un entorno extracelular (p. ej. plasma). Se puede determinar si un conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando el compuesto conjugado de fármaco y proteína dimérica con plasma durante un período de tiempo predeterminado (p. ej. 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y a continuación cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma. Las realizaciones ilustrativas que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes conectores tienen las siguientes estructuras (en donde Ab significa anticuerpo y p, que representa la carga de fármaco (o número promedio de fármacos citostáticos o citotóxicos por molécula de anticuerpo), es de 1 a aproximadamente 8, p. ej. p puede ser de 4 a 6, como de 3 a 5, o p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8).



Los ejemplos en los que se combina un conector escindible con una auristatina incluyen MC-vc-PAB-MMAF (también designado vcMMAF) y MC-vc-PAB-MMAE (también designado vcMMAE), en el que MC es una abreviatura de maleimido caproilo, vc es una abreviatura para el conector basado en Val-Cit (valina-citrulina), y PAB es una abreviatura de carbamato de p-aminobencilo.

Otros ejemplos incluyen auristatinas combinadas con un conector no escindible, tal como mcMMAF (mc (MC es lo mismo que mc en este contexto) es una abreviatura de maleimido caproilo).



En una realización, el radical conector de fármaco es vcMMAE. El radical conector de fármaco vcMMAE y los métodos de conjugación se describen en los documentos WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 y US 11/833.028 (Seattle Genetics, Inc.), y el radical conector del fármaco vcMMAE se une a las proteínas diméricas en las cisteínas utilizando un método similar a los descritos en los mismos.

En una realización, el radical conector de fármaco es mcMMAF. El radical conector de fármaco mcMMAF y los métodos de conjugación se describen en los documentos US7498298, US 11/833.954 y WO2005081711 (Seattle Genetics, Inc.), y el radical conector de fármaco mcMMAF se une a la proteína dimérica en las cisteínas utilizando un método similar a los descritos en los mismos.

En una realización, la proteína dimérica de la presente invención está anclada a un conector quelante, p. ej., tiuxetano, que permite p. ej. que un anticuerpo biespecífico se conjugue con un radioisótopo.

En una realización, la proteína dimérica se conjuga con toxinas o cargas útiles, tales como fármacos, que tienen una función óptima a un pH más bajo que el pH neutro.

En una realización, tanto el primer como el segundo polipéptidos de la proteína dimérica se acoplan directa o indirectamente con los mismos uno o más radicales terapéuticos.

En una realización, solo el primer o segundo polipéptido de la proteína dimérica se acopla directa o indirectamente con uno o más radicales terapéuticos.

5 En una realización, el primer y segundo polipéptidos de la proteína dimérica se acoplan directa o indirectamente a diferentes radicales terapéuticos. Por ejemplo, en realizaciones en las que la proteína dimérica es un anticuerpo biespecífico y se prepara mediante el intercambio controlado del brazo Fab de dos anticuerpos monoespecíficos diferentes, p. ej., un primer y segundo anticuerpos, tales anticuerpos biespecíficos se pueden obtener utilizando anticuerpos monoespecíficos que están conjugados o asociados con diferentes radicales terapéuticos.

10 **Oligómero**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las proteínas diméricas que comprenden al menos las regiones CH2 y CH3, y opcionalmente una región bisagra, de cadenas pesadas de inmunoglobulina pueden formar oligómeros tales como hexámeros no solo cuando se unen a una molécula diana sino también en solución. La oligomerización se produce por asociación no covalente de regiones Fc adyacentes, y en particular se ha observado para anticuerpos que tienen mutaciones en E345, E430 y S440, como se describe en los Ejemplos.

20 En una realización, la invención proporciona un hexámero que comprende seis proteínas diméricas asociadas no covalentemente, cada una de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores. En una realización, al menos una, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o seis proteínas diméricas del hexámero son anticuerpos.

25 En una realización, la invención proporciona un hexámero que comprende seis moléculas asociadas no covalentemente, tales como proteínas diméricas, al menos una de las cuales es de una proteína dimérica según cualquier aspecto o realización anterior y al menos una de las cuales es un anticuerpo que comprende un dominio Fc que comprende al menos las regiones CH2, CH3 y bisagra en las que al menos una de las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, es E, E y S, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal, el anticuerpo monoclonal seleccionado opcionalmente entre los anticuerpos conocidos denominados "segundos anticuerpos" en la sección de más abajo.

30

Composiciones

35 La presente invención también se refiere a una composición que comprende una o más proteínas diméricas de la presente invención, opcionalmente en forma de oligómeros, tales como hexámeros de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende una proteína dimérica de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

40

45 La composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende una proteína dimérica según cualquier aspecto o realizaciones de la presente invención, uno o más anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable.

45

50 En una realización particular, la composición comprende una primera proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención y una segunda proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, deberían ser adecuados para la proteína dimérica de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en base a la falta de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas de la proteína dimérica o la composición farmacéutica de la presente invención (p. ej., un impacto menor que sustancial (10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición relativa, etc.)) sobre la unión al antígeno.

55

Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (p. ej., azúcares, alcoholes de azúcar tales como sorbitol y manitol, o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

60

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción adecuados, y similares que son fisiológicamente compatibles con una proteína dimérica de la presente invención.

- 5 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o varios tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.
- 10 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la proteína dimérica, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.
- 15 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.
- 20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.
- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.
- 30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la ruta de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. La proteína dimérica de la presente invención se puede preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Tales portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.
- 35 40 En una realización, la proteína dimérica de la presente invención se puede formular para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Los portadores farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la proteína dimérica, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.
- 45 50 Las composiciones farmacéuticas para inyección típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la proteína dimérica en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej., como se enumeró anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración para su esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando la proteína dimérica a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos, p. ej., de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables
- 60

estérides, los ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la proteína dimérica en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración para su esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando la proteína dimérica a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de
10 soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

pH

15 Las composiciones de la invención pueden comprender un sistema tampón adecuado para controlar el pH y, por lo tanto, el estado de oligomerización de la proteína o proteínas diméricas presentes. Por ejemplo, a un pH de 6,4 o inferior, tal como a pH 5,0, una proteína dimérica según la invención está predominantemente en forma monomérica, es decir, una proteína dimérica única, mientras que a un pH superior a 6,4, tal como a pH 6,8, la proteína dimérica
20 está predominantemente en forma oligomérica, tal como en forma de hexámero. La forma hexamérica de la proteína dimérica está compuesta por seis proteínas diméricas que se asocian no covalentemente entre sí para formar una forma hexamérica. El término "forma monomérica" en el contexto de la proteína dimérica según la presente invención se refiere a una única proteína dimérica individual, que está compuesta de proteínas diméricas que no se asocian de manera no covalente entre sí. El ejemplo 31 describe cómo se puede observar esto ajustando el pH.

25 En una realización, la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable que es una solución tamponada acuosa.

30 En una realización, el pH de la solución tamponada acuosa es al menos aproximadamente 6,5, tal como de 6,5 a aproximadamente 9,0, tal como de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, tal como aproximadamente 7,4. Los sistemas tampón adecuados para mantener un pH en este intervalo y/o cerca del pH fisiológico incluyen sistemas de tampón fosfato. Por lo tanto, en una realización, la solución tamponada acuosa es un sistema de tampón fosfato. En una realización, la proteína dimérica está predominantemente en forma oligomérica, tal como en
35 forma hexamérica, en un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 6,8.

40 En una realización, el pH de la solución tamponada acuosa es inferior a pH 6,5, tal como de aproximadamente 4,0 a 6,4, tal como de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. Los sistemas tampón adecuados para mantener un pH en este intervalo incluyen sistemas tampón basados en citrato, acetato, histidina y/o glicina. Por lo tanto, en una realización, el sistema tampón es un sistema tampón basado en acetato, histidina, glicina, citrato, nicotinato, lactato y/o succinato. Tales sistemas tampón también pueden ser una combinación de sistemas tampón. La proteína dimérica está predominantemente en forma monomérica, es decir, proteína dimérica única, a un pH inferior a 6,0, tal como aproximadamente 5,0.

45 Como se muestra en el Ejemplo 31, la oligomerización de la proteína dimérica según la invención es un proceso reversible que se puede controlar mediante el pH. Esto podría ser útil para la aplicación en el procesamiento durante la fabricación de la proteína dimérica, tal como las etapas de purificación en donde se pueden evitar la obturación de p. ej. las columnas de purificación, los dispositivos de filtración de flujo translaminar, de filtración frontal y/o de nanofiltración bajando el pH sin comprometer la eficacia del producto final, tal como un anticuerpo. Además, bajando el pH por debajo de 6,8, p. ej., 5,0 y 5,5, durante la purificación pueden mejorar los rendimientos de purificación ya
50 que la proteína dimérica está predominantemente en forma monomérica y, por lo tanto, es menos probable que se coagule que la forma hexamérica de la proteína dimérica, como se demuestra en el Ejemplo 32. Además, la reducción del pH por debajo de 6,8 durante la purificación puede permitir la eliminación de agregados no específicos por cromatografía, tal como el uso de resinas de intercambio catiónico débiles. Por lo tanto, una vez que la proteína dimérica se ha purificado a un pH inferior a 6,8, la forma oligomérica, p. ej., hexamérica se puede restaurar aumentando el pH de la solución a un pH de aproximadamente 6,8.

Mezclas

60 En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende una primera proteína dimérica según la invención, una segunda proteína dimérica según la invención, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

Ventajosamente, las cantidades relativas de la primera proteína dimérica y la segunda molécula dimérica en las composiciones se pueden ajustar para modular el número promedio de unidades de cada proteína dimérica diferente

en los oligómeros/hexameros formados. Esto, a su vez, proporciona un medio para optimizar la función efectora y/o las propiedades de unión a la diana, cuando una o más de las proteínas diméricas y las segundas moléculas se unen a una diana.

5 Si bien es aplicable a todos los tipos de proteínas diméricas de acuerdo con la invención y a todos los tipos de segundas moléculas que contienen Fc, que incluyen, p. ej., proteínas de fusión de Fc con regiones de unión a ligando, las moléculas de anticuerpo están particularmente contempladas para ambos componentes.

10 En una realización, la composición de la invención comprende una primera proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención, una segunda proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización, la segunda proteína dimérica es un anticuerpo, en particular un anticuerpo bien conocido ya en uso clínico o preclínico, tal como un anticuerpo que tiene un perfil de seguridad adecuado. En una realización adicional, dicho segundo anticuerpo puede tener un perfil de seguridad adecuado, pero puede no ser suficientemente eficaz.

20 En una realización, también la primera proteína dimérica es un anticuerpo, de modo que la composición comprende un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, en donde solo el primer anticuerpo es una proteína dimérica de la invención. La combinación de un primer anticuerpo que comprende mutaciones capaces de aumentar una función efectora y un segundo anticuerpo que no comprende dicha mutación puede, como se muestra en el Ejemplo 17, proporcionar un aumento de la función efectora. De ese modo, sin estar limitados por la teoría, se cree que p. ej. se puede utilizar este método para combinar un anticuerpo terapéutico, como un segundo anticuerpo, que se ha demostrado que es seguro, pero no lo suficientemente eficaz por sí solo para una aplicación específica, con una proteína dimérica de acuerdo con la invención, dando como resultado una combinación que es eficaz.

25 Los ejemplos de segundos anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en: (90Y) clivatuzumab tetraxetano; (90Y) tacatuzumab tetraxetano; (99mTc) fanolesomab; (99mTc) nofetumomab Merpentano; (99mTc) pintumomab; 3F8; 8H9; abagovomab; abatacept; abciximab; Actoxumab; adalimumab; adecatumumab; afelimomab; aflibercept; Afutuzumab; alacizumab pegol; albiglutida; ALD518; alefacept; alemtuzumab; Alirocumab; altumomab; Altumomab pentetato; alvircept sudotox; amatuximab; AMG714/HuMax-IL15; anatumomab mafenatox; Anrukinzumab (= IMA-638); apolizumab; arcitumomab; aselizumab; atacicept; atinumab; Atlizumab (= tocilizumab); atorolimumab; baminercept; Bapineuzumab; basiliximab; bavituximab; bectumomab; belatacept; belimumab; benralizumab; bertilimumab; besilesomab; bevacizumab; Bezlotoxumab; biciromab; bifarcept; bivatuzumab; Bivatuzumab mertansina; blinatumomab; blosozumab; brentuximab vedotina; briakinumab; briobacept; brodalumab; canakinumab; cantuzumab mertansina; cantuzumab ravtansina; caplacizumab; capromab; Capromab pendetida; carlumab; catumaxomab; CC49; cedelizumab; certolizumab pegol; cetuximab; Ch.14.18; citatuzumab bogatox; cixutumumab; Clazakizumab; clenoliximab; Clivatuzumab tetraxetano; conatumumab; conbercept; CR6261; crenezumab; dacetuzumab; daclizumab; 30 dalantercept; dalotuzumab; daratumumab; Demcizumab; denosumab; Detumomab; Dorlimomab aritox; drozitumab; dulaglutida; ecomeximab; eculizumab; edobacomab; edrecolomab; efalizumab; efungumab; elotuzumab; elsilimumab; enavatuzumab; enlimomab; enlimomab pegol; enokizumab; ensituximab; epitumomab; epitumomab cituxetano; epratuzumab; erlizumab; ertumaxomab; etanercept; etaracizumab; etrolizumab; exbivirumab; Fanolesomab; faralimumab; farletuzumab; Fasinumab; FBTA05; felvizumab; Fezakinumab; ficlatuzumab; 45 figitumumab; flantuzumab; fontolizumab; foralumab; foravirumab; fresolimumab; fulranumab; galiximab; ganitumab; gantenerumab; gavilimumab; gemtuzumab; Gemtuzumab ozogamicina; gevokizumab; girentuximab; glembatumumab; Glembatumumab vedotina; golimumab; Gomiliximab; GS6624; anticuerpos anti-CD74; anticuerpos anti-cMet como se describe en el documento WO 2011/110642; anticuerpos anti-Her2 como se describe en los documentos WO 2011/147986 o WO 2011/147982; anticuerpo anti-IL8 como se describe en el documento WO 50 2004/058797; anticuerpos anti-TAC como se describe en el documento WO 2004/045512; anticuerpos anti-factor tisular (TF) como se describe en los documentos WO 2010/066803 or WO 2011/157741; ibalizumab; ibritumomab tiuxetan; icrucumab; igovomab; Imciromab; inclacumab; indatuximab ravtansina; infliximab; inolimomab; inotuzumab ozogamicin; intetumumab; yodo (124I) girentuximab; ipilimumab; iratumumab; itolizumab; ixekizumab; keliximab; labetuzumab; lebrikizumab; lemalesomab; lenercept; lerdelimumab; lexatumumab; libivirumab; lintuzumab; 55 lorvotuzumab mertansina; lucatumumab; lumiliximab; mapatumumab; maslimomab; matuzumab; mavrilimumab; mepolizumab; metelimumab; milatuzumab; minretumomab; mirococept; mitumomab; mogamulizumab; morolimumab; motavizumab; moxetumomab; pasudotox; muromonab-CD3; nacolomab tafenatox; namilumab; naptumomab estafenatox; narnatumab; natalizumab; nebacumab; necitumumab; nerelimumab; nimotuzumab; Nivolumab; Nofetumomab; merpentan; obinutuzumab; Ocaratuzumab; ocrelizumab; odulimumab; ofatumumab; olaratumab; 60 olokizumab; omalizumab; onartuzumab; onercept; oportuzumab monatox; oregovomab; otelixizumab; oxelumab; ozoralizumab; pagibaximab; palvizumab; panitumumab; panobacumab; pascolizumab; pateclizumab; patritumab; pegsunercept; Pentumomab; pertuzumab; pexelizumab; Pintumomab; Placulumab; ponezumab; priliximab; primumab; PRO 140; quilizumab; racotumomab; radretumab; rafivirumab; ramucirumab; ranibizumab; raxibacumab; regavirumab; reslizumab; RG1507/HuMax-IGF1R; RG1512/HuMax-pSelectina; rilonacept;

5 rilotumumab; rituximab; robatumumab; roledumab; romosozumab; rontalizumab; rovelizumab; ruplizumab; samalizumab; sarilumab; satumomab; Satumomab pendetida; secukinumab; sevirumab; sibrotuzumab; sifalimumab; siltuximab; siplizumab; sirukumab; solanezumab; solitomab; Sonepcizumab; sontuzumab; sotatercept; stamulumab; sulesomab; suvizumab; tabalumab; Tacatuzumab tetraxetano; tadocizumab; talizumab; tanezumab; taplitumomab
 10 paptox; tefibazumab; telimomab aritox; tenatumomab; teneliximab; teplizumab; teprotumumab; TGN1412; Ticilimumab (= tremelimumab); tigatuzumab; TNX-650; Tocilizumab (= atlizumab); toralizumab; torapsel; tositumomab; tralokinumab; trastuzumab; trastuzumab emtansine; TRBS07; trebananib; tregalizumab; tremelimumab; tucotuzumab celmoleukin; tuvirumab; ublituximab; urelumab; urtoxazumab; ustekinumab; vapaliximab; vatelizumab; vedolizumab; veltuzumab; vepalimomab; vesencumab; visilizumab; volociximab; Vorsetuzumab mafodotina; votumumab; zalutumumab; zanolimumab; ziralimumab; y zolimumab aritox.

15 Las composiciones de acuerdo con este aspecto comprenden así una mezcla de dos o más proteínas diméricas diferentes, cada una de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la invención, tal como se describe anteriormente. Típicamente, bajo las condiciones correctas de pH y/o unión a la diana, se pueden formar en la composición hexámeros que comprenden dos o más proteínas diméricas diferentes, particularmente en una solución acuosa o tampón. Las primera y segunda proteínas diméricas de la presente invención tendrán preferencia para la oligomerización entre sí en comparación con cualquier proteína dimérica natural o de tipo salvaje como se muestra en el Ejemplo 3.

20 En una realización, dichas primera y/o segunda, tal como ambas, proteínas diméricas comprenden polipéptidos de cadena pesada en donde, para uno o ambos, tales como cada uno de los polipéptidos, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G e Y, respectivamente.

25 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dichas primera y/o segunda proteínas diméricas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son K, G e Y, respectivamente.

30 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dichas primera y/o segunda proteínas diméricas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, S e Y, respectivamente.

35 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dichas primera y/o segunda proteínas diméricas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G y W, respectivamente.

40 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dichas primera y/o segunda proteínas diméricas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 e Y436 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G e I, respectivamente.

45 En una realización, cualquiera de las primera o segunda proteínas diméricas mencionadas comprende los aminoácidos indicados en ambos primer y segundo polipéptidos mencionados, y la otra proteína dimérica comprende los aminoácidos indicados solamente en dichos primer o segundo polipéptidos.

En una realización, ambas dichas primera y segunda proteínas diméricas comprenden los aminoácidos indicados en ambos primer y segundo polipéptidos mencionados.

50 En algunas realizaciones, los aminoácidos en ciertas posiciones en los polipéptidos de la cadena pesada difieren entre la primera y segunda proteínas diméricas para ajustar la fuerza o especificidad de la asociación no covalente de las dos proteínas diméricas. Esto se puede lograr, p. ej., mediante el uso de la primera y/o segunda proteínas diméricas que tienen aminoácidos específicos en las posiciones correspondientes a K439, S440, K447, K448 y/o K449, como se describió anteriormente.

55 La Tabla 2 muestra aminoácidos ilustrativos para estas posiciones en la primera proteína dimérica y la segunda proteína dimérica que se utilizarán juntos, separados por un signo "+". En cualquiera de estos aspectos y realizaciones, una o ambas de la primera y segunda proteínas diméricas pueden ser un anticuerpo (p. ej., Ab1 y Ab2, respectivamente).

Tabla 2: Posiciones ilustrativas y aminoácidos que pueden estar presentes adicionalmente en dos proteínas diméricas (por ejemplo, Ab1 + Ab2)

Par de aminoácidos (IgG1)	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
K439 + S440	439DER + 440DEKR	439E + 440K
K447 + K447 /448	447DE + 447KRH/448P	447E + 447/448P
K447 + K447/448 /449	447DE + 447KRH/448KRH/449P	447E + 447K/448K/449P

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un primer y segundo polipéptidos de una primera proteína dimérica, en donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, K439 y S440 en la cadena pesada de IgG1 humana son R, G, E e Y, respectivamente, y un primer y segundo polipéptidos de una segunda proteína dimérica, en donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, Y436 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son R, G, I y K, respectivamente, que está predominantemente en forma oligomérica, en un tampón fosfato a un pH de aproximadamente 6,8, que está predominantemente en forma monomérica a un pH de menos de 6,0.

10 En una realización adicional, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de la primera proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 en una cadena pesada de IgG1 humana, es D o E, y en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dicha segunda proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 en una cadena pesada de IgG1 humana, es K, R o H, y un aminoácido en la posición correspondiente a 448 en una cadena pesada de IgG1 humana, es P.

15 En una realización, en dichos primer y/o segundo polipéptidos de la primera proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 en una cadena pesada de IgG1 humana, es D o E, y en dichos primer y/o segundo polipéptidos de dicha segunda proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 en una cadena pesada de IgG1 humana, es K, R o H, y el aminoácido en la posición correspondiente a 448 en una cadena pesada de IgG1 humana, es K, R o H, y un aminoácido en la posición correspondiente a 449 en una cadena pesada de IgG1 humana, es P.

20 En una realización, cualquiera de la primera o segunda proteínas diméricas mencionadas comprende los aminoácidos indicados en ambos primer y segundo polipéptidos mencionados, y la otra proteína dimérica comprende los aminoácidos indicados solamente en el primer o segundo polipéptidos mencionados.

25 En una realización, ambas primera y segunda proteínas diméricas mencionadas comprenden los aminoácidos indicados en ambos primer y segundo polipéptidos mencionados. En una realización adicional, la primera o segunda proteínas diméricas pueden ser un anticuerpo, y la otra proteína dimérica puede ser una proteína de fusión o un producto conjugado como se describe en la presente memoria.

30 En una realización, en el primer y/o segundo polipéptidos de dicha primera proteína dimérica, las posiciones de aminoácidos correspondientes a E345, E430, S440 y K447, en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G, Y y D/E, respectivamente, y en el primer y/o segundo polipéptidos de dicha segunda proteína dimérica, las posiciones de aminoácidos correspondientes a E345, E430, S440, K447 y 448, en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G, Y, K/R/H y P, respectivamente, o viceversa.

35 En una realización, en el primer y/o segundo polipéptidos de dicha primera proteína dimérica, las posiciones de aminoácidos correspondientes a E345, E430, S440 y K447, en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G, Y y D/E, respectivamente, y en el primer y/o segundo polipéptidos de dicha segunda proteína dimérica, las posiciones de aminoácidos correspondientes a E345, E430, S440, K447, 448 y 449, en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G, Y, K/R/H, K/R/H y P, respectivamente, o viceversa.

40 En una realización particular, la composición que comprende una primera y segunda proteínas diméricas, tanto el primer como el segundo polipéptidos de dichas primera y segunda proteínas diméricas comprenden los aminoácidos indicados en las posiciones específicas.

45 En una realización, al menos una de dichas primera y segunda proteínas diméricas es un anticuerpo.

En una realización, tanto la primera como la segunda proteínas diméricas son anticuerpos.

50 En una realización, dicha primera y/o segunda, tal como al menos una, de dichas proteínas diméricas es una proteína heterodimérica, tal como un anticuerpo biespecífico. Puede ser cualquier proteína heterodimérica descrita en la presente memoria.

55 En una realización, dichos primer y segundo anticuerpos, se unen al mismo epítipo del mismo antígeno.

- En una realización, dichos primer y segundo anticuerpos comprenden las mismas secuencias de región de cadena pesada y ligera variables.
- 5 En una realización, dichos primer y segundo anticuerpos se unen a diferentes antígenos o a diferentes epítomos en el mismo antígeno.
- En otra realización, dicha primera y/o segunda, tal como al menos una, de dichas proteínas diméricas es una proteína de fusión.
- 10 En una realización, la composición comprende al menos una proteína dimérica adicional de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la invención, tal como tres o seis, o tal como cuatro, cinco, siete, ocho, nueve o más proteínas diméricas.
- 15 En otra realización, dicha primera y/o segunda, tal como al menos una, de dichas proteínas diméricas es un fragmento Fc.
- En una realización, la composición comprende más de dos, tal como tres, cuatro, cinco o seis, proteínas diméricas diferentes de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la invención.
- 20 En una realización, la composición comprende dos proteínas diméricas según cualquier aspecto o realización de la presente invención, en donde dicha primera proteína dimérica está conectada a un primer profármaco, y dicha segunda proteína dimérica está conectada a un segundo profármaco. Por ejemplo, uno del primer y segundos profármacos puede ser capaz de activar al otro.
- 25 En una realización, solo una de las primera y segunda proteínas diméricas comprende una región de unión a la diana. Esto se puede utilizar, p. ej., para composiciones farmacéuticas en las que una proteína dimérica de "solo Fc" se conjuga con un compuesto terapéutico o de diagnóstico mezclado con una proteína dimérica que tiene especificidad de unión para una diana.
- 30 En una realización, tanto la primera como la segunda proteínas diméricas comprenden una región de unión a la diana. Si la primera y la segunda proteínas diméricas son proteínas heterodiméricas, se pueden unir a los diferentes epítomos sobre la misma diana o a diferentes dianas. Se prevé cualquier combinación con respecto a tal unión. Al seleccionar diferentes epítomos y/o dianas para cada proteína dimérica, la formación de hexámeros se puede optimizar para que ocurra principalmente en células, bacterias o viriones que expresan ambos epítomos o dianas.
- 35 Esto proporciona un mecanismo para guiar una respuesta inmunitaria hacia tipos de células específicas. Además, una mezcla de proteínas diméricas que se unen a diferentes epítomos en la misma molécula diana puede proporcionar un efecto similar al de un anticuerpo policlonal.
- 40 En algunas realizaciones, al menos una de la primera y segunda proteínas diméricas es un anticuerpo como se define en la presente memoria.
- En una realización, la primera y la segunda proteínas diméricas son anticuerpos, que representan un primer y segundo anticuerpo. En una realización, los anticuerpos se unen al mismo epítomo del mismo antígeno. Opcionalmente, las regiones de unión a antígeno de los dos anticuerpos son idénticas, es decir, comprenden las
- 45 mismas secuencias de región de cadena pesada y ligera variables.
- En otra realización, el primer y segundo anticuerpos se unen a diferentes antígenos o a diferentes epítomos sobre el mismo antígeno.
- 50 En otra realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen a diferentes antígenos sobre diferentes células.
- En una realización, el primer y el segundo anticuerpos se pueden seleccionar cada uno del grupo que consiste en, pero no se limita a, anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos y multiespecíficos. Adicionalmente, en cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores, al menos una de la primera y segunda proteínas diméricas puede ser un
- 55 anticuerpo que comprende al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo conocido en uso clínico o preclínico, p. ej., seleccionado entre los "segundos anticuerpos" enumerados anteriormente.
- Los ejemplos no limitantes de las composiciones incluyen
- 60 a) una primera proteína dimérica de la invención que comprende una región de unión;
- b) una primera y segunda proteínas diméricas de la invención, en donde dichas primera y segunda proteínas diméricas se unen a diferentes epítomos sobre la misma diana o a diferentes dianas
- c) Una primera proteína dimérica y una segunda proteína dimérica, en donde cualquiera de la primera o segunda proteínas diméricas comprende una mutación de aminoácidos que modula una o más funciones

efectoras y/o perfil farmacocinético de dicha primera o segunda proteínas diméricas.

La primera y segunda proteínas diméricas también pueden incluir combinaciones de los aspectos descritos en a) a c).

5 En una realización, la especificidad aumenta cuando una combinación de la primera y segunda proteínas diméricas se une a su diana sobre una célula o virión que expresa la diana.

10 En cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores, la composición puede comprender al menos una proteína dimérica adicional según la invención. Por ejemplo, la composición puede comprender tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más proteínas diméricas, cada una según un aspecto o realización de la invención. Las cantidades relativas de cada proteína dimérica se pueden ajustar para optimizar una propiedad deseada de los hexámeros formados, p. ej., especificidad de células diana, función efectora, avidéz y/o estabilidad de hexámeros. Adicionalmente, una composición que comprende proteínas diméricas que se unen a diferentes epítomos sobre la misma diana puede parecerse o funcionar como una composición de anticuerpos policlonales.

15 La proteína dimérica y la segunda molécula comprendidas en cada una de las composiciones descritas anteriormente pueden proporcionarse alternativamente como un kit de partes, para uso simultáneo, separado o secuencial, p. ej., en la generación de imágenes o terapia.

20 **Métodos**

La presente invención también se refiere a un método para aumentar la oligomerización en solución de una proteína dimérica que comprende un primer y segundo polipéptidos, cada uno de los cuales comprende al menos regiones CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, comprendiendo el método la introducción en dicho primer y segundo polipéptidos, de sustituciones de aminoácidos en al menos las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, que son R, G e Y, respectivamente; o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración Eu como se expone en Kabat.

25 En una realización, dichos primer y/o segundo polipéptidos pueden comprender adicionalmente una región susceptible de unión covalente entre dichos primer y segundo polipéptidos.

35 En una realización, dichos primer y/o segundo polipéptidos pueden comprender adicionalmente una región bisagra.

En una realización, el método comprende introducir sustituciones de aminoácidos en dichos primer y segundo polipéptidos en al menos las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana.

40 En una realización, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 son 345R, 430G y 440Y, respectivamente.

45 En una realización, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son 345K, 430G y 440Y, respectivamente.

En una realización, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son 345R, 430S y 440Y, respectivamente.

50 En una realización, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son 345R, 430G y 440W, respectivamente.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, cada polipéptido puede comprender una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina asociada con una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende regiones variables y constantes de cadena ligera para formar una primera y una segunda región de unión a antígeno, opcionalmente uniéndose al mismo antígeno.

60 En la realización anterior, cada polipéptido de la proteína dimérica puede comprender una región constante de cadena pesada completa, tal como una región constante de cadena pesada de IgG1 humana completa.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína dimérica parental puede ser un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 completo.

La invención también proporciona cualquier proteína dimérica de acuerdo con cualquier aspecto o realización en la

presente memoria descrita, preparada por el método de cualquiera de las realizaciones anteriores.

5 La presente descripción también describe un método para la purificación de una proteína dimérica según la presente invención que comprende la purificación en una columna de proteína A o proteína G a un pH inferior a 6,8, tal como entre 5,0 y 6,5, p. ej., entre 5,0 y 6,0, p. ej., entre 5,0 y 5,5, y posteriormente elevar el pH por encima de 6,8 o por encima de pH 7,0. Los tampones para ajustar el pH pueden ser cualquiera de los descritos en la presente memoria.

Kit de partes

10 La presente invención también se refiere a un kit de partes que comprende una primera proteína dimérica de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria, y una segunda proteína dimérica de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria, para uso simultáneo, separado o secuencial en la generación de imágenes, diagnóstico o terapia.

Usos

15 Como se describe en la presente memoria, la proteína dimérica de la presente invención forma estructuras hexaméricas en solución, que se asemejan a las moléculas de IgM. Además, como se describió anteriormente, se prevén combinaciones de una primera y segunda proteínas diméricas de la presente invención, u opcionalmente una
20 segunda molécula que no es una proteína dimérica según la invención, en donde los diferentes componentes de la combinación se unen a diferentes epítomos sobre la misma diana para crear composiciones que se parecen a las composiciones de anticuerpos policlonales. Estas características y otras características de la proteína dimérica de la presente invención la hacen particularmente adecuada para ciertas aplicaciones.

Característica de tipo IgM

- La IgM tiene un papel importante en la respuesta inmunitaria a los organismos infecciosos. Es un potente activador de la vía clásica del complemento.
- 30 • Los anticuerpos contra los carbohidratos son a menudo de isotipo IgM. Los carbohidratos son dianas potenciales para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas o virales, cáncer y enfermedades autoinmunitarias.
- Se describe que los anticuerpos IgM tienen propiedades inmunorreguladoras y que son protectores en diversas enfermedades autoinmunitarias, como el lupus (LES) y la esclerosis múltiple. La IgM también tendría un papel protector en la aterosclerosis, infarto de miocardio e ictus, enfermedad cerebral de vasos
35 pequeños y enfermedad de Alzheimer. (Groenwall et al 2012, Frontiers in Immunology 3, 1-10)
- Los anticuerpos naturales contra las células cancerosas a menudo son del isotipo IgM.
- La IgM (y la IgA polimérica) tiene una función en la exclusión inmunitaria en el lado luminal de las superficies mucosas. Para la inmunización pasiva, se pueden suministrar directamente niveles protectores de IgM (e IgA polimérica) a las superficies de las mucosas.
- 40 • Se están desarrollando productos basados en IgM para indicaciones autoinmunitarias, de cáncer y de infección.

45 La proteína dimérica de la presente invención podría imitar las características similares a IgM de las enumeradas anteriormente cuando se encuentra en una solución de pH ajustado, tal como pH 6,5 a 7,0, y por lo tanto se prevé que la proteína dimérica de la invención pueda utilizarse para el tratamiento de cualquiera de dichas indicaciones.

Además, ajustando el pH de la solución, las proteínas diméricas de la invención pueden estar en forma monomérica, es decir, como una proteína dimérica única o en forma hexamérica (como se describe en el Ejemplo 32). El término "forma monomérica" en el contexto de la proteína dimérica según la presente invención se refiere a una única
50 proteína dimérica individual, que está compuesta de proteínas diméricas que no se asocian de manera no covalente entre sí. Cuando se hace referencia a una "forma hexamérica", se debe entender como un complejo de seis proteínas diméricas individuales asociadas no covalentemente. Se prevé que los métodos de producción y purificación convencionales utilizados para las moléculas de IgG se puedan utilizar para las proteínas diméricas de la invención cuando están en forma monomérica, tal como, entre otros, el uso de resinas de proteína A y resinas
55 variantes de proteína A para purificación, y el uso de ensayos de detección de dominios de inmunoglobulina basados en proteína A y variantes de proteína A, por ejemplo, aplicados en el control del procedimiento, y el uso de cromatografía de intercambio catiónico para la eliminación concomitante de agregados durante la purificación de proteínas, y el uso de nanofiltración para el aclaramiento viral, evitando así problemas a menudo encontrados al producir o purificar proteínas IgM.

60

Aclareamiento rápido

- La forma hexamérica de las proteínas diméricas de la presente invención se aclara rápidamente a menos que se combine con tecnologías que eviten el aclareamiento rápido como se describe en la presente memoria. Los productos de fragmentos Fab, que también se aclaran rápidamente, se están desarrollando/utilizando para el tratamiento de envenenamientos, intoxicaciones por venenos y para agotar el exceso o la abundancia de ligandos y/o factores solubles.
- Las proteínas diméricas de la presente invención podrían tener aplicaciones similares.
- Las proteínas diméricas de la presente invención también se podrían utilizar para agotar formas solubles/desprendidas de proteínas de membrana que formarían un sumidero para la terapia dirigida a células.

Aspectos policlonales

- Los productos de anticuerpos policlonales tienen el potencial de acción sinérgica (mejor eficacia) y podrían superar la resistencia adquirida a la terapia.
- Se están desarrollando/utilizando productos de anticuerpos policlonales para el tratamiento de infecciones virales o bacterianas, envenenamiento (púrpura trombocitopénica inmunitaria), toxicidad por digoxina, rechazo agudo de trasplante renal y cáncer.

Así, la proteína dimérica de la presente invención, tiene aplicaciones similares y, por lo tanto, es adecuada para su uso en el tratamiento de cualquiera de dichas indicaciones.

Por tanto, en una realización, las proteínas diméricas de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de cualquiera de las siguientes indicaciones: enfermedades autoinmunitarias, que incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, síndrome de Sjögrens, síndrome CREST, opsoclon, miopatía inflamatoria, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda, neuropatía motora multifocal MMN, artritis reumatoide, osteoartritis, hepatitis autoinmunitaria, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangiítis microscópica, Síndrome de Churg-Strauss, polimiositis, escleromiositis, miastenia gravis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, síndrome cerebeloso paraneoplásico, síndrome de la persona rígida, encefalitis límbica, corea de Sydenham, PANDAS, encefalitis límbica, diabetes mellitus tipo 1, ataxia, epilepsia parcial continua, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia perniciosa, anemia de Addison, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, enfermedades hemolíticas autoinmunitarias, tales como anemia autoinmunitaria hematológica y trombocitopenia asociada al VIH, pénfigo, penfigoide ampolloso, dermatitis hepatoforme, dermatosis lineal de IgA, vitiligo, síndrome de Goodpasture, miocarditis, miocardiopatía dilatada idiopática, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, cáncer, infecciones bacterianas, infecciones virales y fúngicas, intoxicación y envenenamiento, o enfermedades vasculares u otras.

Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, varios tipos de cáncer, tales como: tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo), cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, melanoma maligno, sarcoma (tejido blando, p. ej., hueso y músculo), tumores de origen primario desconocido (es decir, primarios desconocidos), leucemia, cáncer de médula ósea (tal como mieloma múltiple), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no Hodgkin, leucemia mieloides aguda (LMA), cáncer de piel, glioma, cáncer de cerebro, útero y recto.

Por lo tanto, la presente descripción también describe un método para prevenir o tratar una enfermedad, tal como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, diabetes mellitus, rechazos de trasplantes de órganos, enfermedades oftalmológicas y agotamiento de C1q en el sistema humeral, que comprende la administración de una proteína dimérica, oligómero, hexámero, composición, kit de partes según cualquier aspecto o realización de la presente invención.

El cáncer puede ser un tumor, tal como un tumor cerebral. La proteína dimérica según la invención se puede utilizar para obstruir mecánicamente el flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos tumorales mediante inyección directamente en el tumor, tal como tumores cerebrales. La proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la presente invención, puede ser particularmente útil para inducir obstrucción mecánica en tumores debido a su capacidad para formar oligómeros, tales como dímeros, trímeros y hexámeros. Cuando la proteína dimérica, tal como un anticuerpo, de acuerdo con la presente invención se emplea en el tratamiento del cáncer, es particularmente útil para superar la supresión de los mecanismos efectores debido al bajo pH del microentorno tumoral.

En una realización, la proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, se emplean en el tratamiento de tumores haciendo uso del suministro dependiente del pH de toxinas o cargas útiles/fármacos. En tales usos, el pH más bajo en el sitio del tumor puede explotarse cuando la proteína dimérica, tal como un anticuerpo, de la presente invención se fusiona con una toxina o fármaco que tiene una función óptima en el pH más bajo en el sitio del tumor.

El método puede comprender las etapas de administración al torrente sanguíneo de una primera proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención conectada a un primer profármaco, y una segunda proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la invención conectada a un segundo profármaco.

La presente descripción también describe un método para inducir una función efectora inmunomoduladora, por ejemplo, mediada a través de CD32b y KIR, en donde el método comprende la administración de la proteína dimérica, oligómero, hexámero, composición o kit de partes de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, opcionalmente combinada con sialilación de la proteína dimérica. La proteína dimérica de la invención inducirá la agrupación de las moléculas diana y de ese modo inducirá la función efectora inmunomoduladora. Por lo tanto, la proteína dimérica según la invención se puede utilizar como una alternativa a la inmunoglobulina intravenosa (IVIG).

En una realización, la proteína dimérica, tal como un anticuerpo o proteína de fusión de Fc, de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, se puede utilizar para mejorar el aclaramiento de una molécula diana del torrente sanguíneo, tal como un ligando, un receptor, una toxina, C1q, IgE, un anticuerpo anti-injerto, anti-anticuerpos humanos (HAHA), anticuerpos antifármaco (ADA), anti-anticuerpos murinos humanos (HAMA), anti-anticuerpos quiméricos humanos (HACA), compuestos farmacéuticos y compuestos inmunomoduladores.

La proteína dimérica según la invención, tal como un fragmento Fc fusionado a un antígeno, puede tener un efecto inmunoestimulador mejorado cuando está en forma oligomérica, tal como una molécula hexamérica, ya que el oligómero proporciona complejos de antígeno que, por ejemplo, estimulan la agrupación de receptores de células B dirigidos contra dicho antígeno, y facilitan la maduración por afinidad de los receptores iniciales de células B de baja afinidad presentando el antígeno en una forma multivalente. Esto se puede obtener tanto cuando la proteína dimérica según la invención está en solución como cuando se presenta sobre la superficie de una célula, virión, partícula similar a un virus, incluida en un liposoma o en otras formas que apoyan la presentación de proteínas transmembrana comúnmente conocidas en la técnica. Así, en una realización, la proteína dimérica, tal como un fragmento Fc, de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, se emplea en vacunación, inmunización y estimulación de la respuesta inmunitaria.

La proteína dimérica según la invención, se puede utilizar para crear estructuras supramoleculares, que opcionalmente se pueden ensamblar de manera dependiente del pH, tanto en solución como en una superficie, tal como, pero sin limitarse a, la superficie de una célula, virión, partícula similar a virus, liposoma, microchip, superficie sólida, armazón poroso u otros métodos para la presentación de proteínas comúnmente conocidos en la técnica.

En una realización, dichos primer y/o segundo polipéptidos de la proteína dimérica pueden comprender un dominio de unión a proteínas, tal como un dominio Fab, que se une específicamente a un dominio Fab en un polipéptido que contiene un dominio Fc diferente. La proteína dimérica y su molécula diana se pueden utilizar para la formación de estructuras supramoleculares, que opcionalmente se pueden ensamblar de manera controlada por el pH.

En una realización, la proteína dimérica según cualquier aspecto o realización de la presente invención se utiliza en la cristalización de proteínas. La proteína dimérica puede ser particularmente útil debido a su capacidad para formar estructuras oligoméricas de manera controlada por el pH.

En una realización, la presente invención se refiere a la proteína dimérica según cualquier aspecto o realización en la presente memoria descrita para su uso en la formación de complejos inmunitarios en kits de diagnóstico, tales como un ensayo de aglutinación. Un ejemplo de un ensayo de aglutinación es la prueba de Coombs.

Los ejemplos de infecciones bacterianas incluyen, pero no se limitan a, infección por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), p. ej. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), infección por *Pseudomonas aeruginosa*, infecciones causadas por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *S. epidermidis*, *S. pneumonia*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *S. typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, y *Mycobacterium tuberculosis*. Los ejemplos de infecciones virales y fúngicas incluyen, pero no se limitan a, virus del Nilo Occidental, virus del dengue, virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), RVS, *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, citomegalovirus humano (HCMV), virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio humano, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr, virus del herpes, virus de la viruela y virus de la gripe aviar. Los ejemplos de intoxicación y envenenamiento incluyen, entre otros, digoxina, colchicina, veneno de reptiles tal como el veneno de serpiente, veneno de insectos tal como el veneno de abeja, avispa y oruga, veneno de araña, endotoxinas y exotoxinas microbianas, tales como neurotoxinas

de botulinum, toxina tetánica, toxinas estafilocócicas, toxina alfa, toxina de ántrax, toxina de difteria, toxina pertussis, toxina Shiga, toxina tipo Shiga.

5 Los ejemplos de enfermedades vasculares y otras enfermedades pueden ser, p. ej., aterosclerosis, infarto de miocardio e ictus, enfermedad de vasos pequeños cerebrales, enfermedad de Alzheimer y agotamiento de C1q en la resistencia a la insulina hepática inducida por una dieta de alto contenido de grasas y tolerancia sistémica a la glucosa, y aclaramiento de anticuerpos antiinjerto antes o después del trasplante de órganos.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición o kit de partes de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones descritas en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, tal como una infección bacteriana, viral o parasitaria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, inflamación y/o reducción del riesgo de choque séptico causado por una infección bacteriana.

15 Para el tratamiento de infecciones bacterianas y/o la reducción del riesgo de choque séptico, la proteína dimérica de la invención puede comprender, por ejemplo, una región de unión que se une específicamente a un lipopolisacárido (LPS), un lipooligosacárido (LOS), una endotoxina delta, toxina botulínica, exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae*, un superantígeno bacteriano, una enterotoxina termoestable, citolisina, una toxina formadora de canales, una toxina enzimáticamente activa o una micotoxina.

20 En otro aspecto, la invención proporciona la proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en la generación de imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición o kit de partes según la invención para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana, viral o parasitaria, para la generación de imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero, o para modular el aclaramiento de una molécula diana del organismo de un ser humano u otro mamífero.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a la proteína dimérica, hexámero, composición o kit de partes según la invención para su uso en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, rechazos de trasplantes de órganos y agotamiento de C1q en el sistema humoral.

EJEMPLOS

35 Ejemplo 1

Diseño y generación de mutantes 005 del anticuerpo CD38

40 El anticuerpo monoclonal humano HuMab 005 es un anticuerpo IgG1, κ completamente humano descrito en el documento WO/2006/099875, que se dirige contra CD38 humano. Aquí, se utilizó como anticuerpo modelo para probar la capacidad de las mutaciones de Fc para mejorar la actividad de la CDC. Las mutaciones probadas se enumeran en la Tabla 3.

45 Las construcciones de ADN para los diferentes mutantes se prepararon y transfectaron transitoriamente utilizando la cadena pesada de HuMab 005 con el alotipo IgG1m(f) como molde para las reacciones de mutagénesis. Brevemente, los mutantes se prepararon utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, EE. UU.). Se utilizaron un cebador directo y uno inverso que codificaban la mutación deseada para replicar el molde de ADN plasmídico completo que codificaba la cadena pesada de 005 con el alotipo IgG1m(f). La mezcla de ADN resultante se digirió utilizando *DpnI* para eliminar el ADN plasmídico de origen y se empleó para transformar *E. coli*.
50 El ADN plasmídico mutante aislado de las colonias resultantes se verificó mediante secuenciación de ADN (Agowa, Alemania). Las mezclas de ADN plasmídico que codificaban tanto la cadena pesada como la cadena ligera de los anticuerpos se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente según lo descrito por el fabricante.

55 Para probar la relevancia funcional de las interacciones oligoméricas Fc-Fc en la activación del complemento y la CDC, los aminoácidos del parche hidrófobo en la interfase Fc:Fc se mutaron para interrumpir potencialmente la interacción lateral Fc-Fc y la eficacia de la CDC de 005. Se introdujeron las mutaciones I253D y H433A para cambiar la carga en las posiciones que se eligieron en función de la estructura cristalina de 1HZH y se describió que estaban expuestos en parches hidrófobos en el dominio CH2-CH3 (Burton Mol Immunol marzo 1985; 22(3):161-206)).

60 La estructura cristalina de 1HZH muestra que 1253 y H433 se unen a dos bolsas diferentes en las posiciones opuestas de Fc del anticuerpo asociado. Para excluir la posibilidad de que la interrupción de los sitios de unión directa para C1q fuera la causa de los efectos observados en la CDC, se generaron mutantes K439E y S440K. Como se muestra en **Figura 4**, K439 y S440 se enfrentan entre sí en lados opuestos en la interfase Fc:Fc, por lo que

se diseñaron K439E y S440K para inducir la pérdida de CDC como mutante único al inhibir la interacción Fc:Fc, pero se esperaba que restauraran la CDC cuando interactuaran entre sí, debido a las interacciones restauradas de Fc:Fc en la mezcla de anticuerpos.

Tabla 3: conjunto de mutaciones que se introdujeron en el dominio CH2-CH3 de 005 (HuMax-CD38).

Mutación	Carga aa WT	Carga aa mutante
I253D	=	-
E345R	-	+
H433A	δ +	=
K439E	+	-
S440K	=	+
(=) sin carga (-) carga negativa (+) carga positiva (δ +) carga positiva parcial		

5

Ejemplo 2

Unión de CD38 sobre células por mutantes HuMab-005

10 La unión de muestras de anticuerpos no purificados a células Daudi y Raji positivas para CD38 se analizó mediante análisis FACS. Se incubaron 10^5 células en 100 μ L en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno con diluciones seriadas de preparaciones de anticuerpo (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 μ g/mL) en RPMI1640/BSA al 0,1% a 4°C durante 30 min. Después de lavar dos veces en RPMI1640/BSA al 0,1%, las células se incubaron en 50 μ L con anti-IgG humana F(ab')₂ de conejo conjugado con FITC (Núm. de cat. F0056; DAKO; 1:150) a 4°C durante 30 min. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 100 μ L PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.01. Como control negativo, se utilizó el sobrenadante de células transfectadas de manera simulada.

20 La unión de HuMab 005 a las células Daudi no se vio muy afectada por la introducción de mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3. Todos los anticuerpos probados se unieron a las células Daudi de una manera dependiente de la dosis. La unión fue similar a la de HuMab-005 de tipo salvaje para todos los mutantes probados, con la excepción de 005-E345R, que mostró una ligera disminución de la unión. Sin embargo, sin estar limitados por ninguna teoría, la unión inferior podría ser el resultado de una disminución de la unión por el anticuerpo secundario. La avidez de unión real por 005-E345R podría ser similar o incluso mayor en comparación con 005-WT, sin embargo, los autores de la presente invención no pudieron confirmar esto debido a la falta de anticuerpos marcados directamente.

30 La unión de HuMab-005 a las células Raji tampoco se vio muy afectada por la introducción de mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3. Todos los anticuerpos probados se unieron a las células Raji de una manera dependiente de la dosis. La unión máxima fue similar a la de 005 de tipo salvaje para los mutantes 005-I253D y H433A e inferior para los mutantes 005-E435R, K439E, S440K y la combinación de 005-K439E + 005-S440K. Sin embargo, sin estar limitados por ninguna teoría, la unión inferior podría ser el resultado de una disminución de la unión por el anticuerpo secundario (blindaje del epítipo).

35 Ejemplo 3

Ensayo de CDC sobre células positivas para CD38 por mutantes del anticuerpo contra CD38 005

40 Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 μ g/mL) en un volumen total de 100 μ L durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μ L de suero humano normal como fuente de C1q (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μ L de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

45 El impacto de la mutación E435R sobre la CDC se analizó adicionalmente en células Wien133 con diferente concentración de suero humano normal (NHS). Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 μ g/mL) en un volumen total de 50 μ L. A continuación, se añadió NHS como fuente de C1q para alcanzar una concentración final

50

de 20% o 50% de NHS en un volumen total de 100 μ L. La mezcla de reacción se incubó en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μ l de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 5** muestra que 005-I253D, H443A, K439E y S440K mostraron una pérdida completa de actividad de CDC tanto sobre células Daudi (**Figura 5A**) como Raji (**Figura 5B**), mientras que el mutante 005-E345R mostró una actividad CDC fuertemente mejorada en ambas líneas celulares. Comparable con los datos de 7D8, una combinación de 005-K439E + 005-S440K, que dan ambas como resultado la pérdida de CDC como mutante único, dio como resultado una CDC restaurada. Sorprendentemente, 005-E435R incluso indujo fuertemente CDC sobre las células Wien133, para las cuales 005 de tipo salvaje no es capaz de inducir la destrucción por CDC (**Figura 5C**). Se observó la destrucción por CDC mediante 005-E345R sobre células Wien133 con concentraciones séricas de 20% y 50% (**Figura 5C**). En las células Raji, tanto 7D8-E345R como 005-E345R mostraron CDC mejoradas *in vitro* en suero al 50%, con una eficacia similar a la del suero al 20% (**Figura 5D**).

Puesto que la mutación E345R en la región CH2-CH3 dio como resultado una actividad CDC mejorada tanto en el anticuerpo contra CD20 7D8 como en el anticuerpo contra CD38 005 probados, la mutación E345R se considera una modificación general del anticuerpo que se puede aplicar para inducir o mejorar la CDC.

Ejemplo 4

Los anticuerpos IgG1 que contienen la mutación E345R potenciadora de CDC son menos sensibles a la inhibición de CDC por el péptido de unión a Fc DCAWHLGELVWCT que los anticuerpos de tipo salvaje

Al mutar las posiciones de aminoácidos en el parche hidrófobo en la interfase Fc:Fc de IgG, se descubrió que la eficacia de la CDC estaba alterada o aumentada. La participación de las interacciones en la interfase Fc-Fc y, por lo tanto, posiblemente la formación de una estructura oligomérica (p. ej., anillo hexamérico) como se observa en la estructura cristalina b12, en la eficacia de la CDC, se exploró adicionalmente. Por lo tanto, se utilizó un péptido de 13 residuos (DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 7)) que se dirige a un sitio de unión consenso en la región del parche hidrófobo sobre la superficie de Fc de IgG de tipo salvaje (Delano et al., Science 2000 18 de febrero; 287 (5456):1279-83). De hecho, la identificación del sitio de unión consenso sobre la superficie de Fc de IgG como una región adaptativa que está cebada para la interacción con una variedad de moléculas distintas (Delano et al., Science 2000 18 de febrero; 287 (5456):1279-83), es compatible con la identificación de los aminoácidos centrales en el parche hidrófobo que están implicados en la interacción Fc-Fc en la estructura cristalina b12 de IgG1 (Saphire et al., Science 2001 10 de agosto; 293 (5532):1155-9). Las interacciones que están presentes en todas las interfases de unión están mediadas por un conjunto compartido de seis aminoácidos (Met-252, Ile-253, Ser-254, Asn-434, His-435 y Tyr-436), así como contactos de la cadena principal compartidos (Delano et al., Science 2000 18 de febrero; 287 (5456):1279-83). Por consiguiente, se espera que el péptido de unión a Fc afecte a la interacción Fc-Fc y, en consecuencia, la eficacia de la CDC.

Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Daudi en 75 μ l con 1,0 μ g/ de mL anticuerpo no purificado en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Se añadieron 25 μ l de una serie de concentraciones (intervalo de concentración final de 0,06-60 μ g/mL) del péptido de unión a Fc DCAWHLGELVWCT a las células opsonizadas y se incubaron durante 10 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μ L de NHS como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 25 μ L de medio RPMI enfriado con hielo, con un suplemento de BSA al 0,1%. Se añadieron 15 μ l de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante análisis FACS.

Se encontró que la CDC mediada por 005 de tipo salvaje (**Figura 6**) era inhibida por el péptido de unión a Fc DCAWHLGELVWCT de una manera dependiente de la dosis. Estos datos de competición sugieren nuevamente la participación de las interacciones Fc-Fc en el parche hidrófobo de IgG en la eficacia de la CDC. El mutante E345R de IgG1-005 con una CDC mejorada fue menos sensible a la competición por el péptido de unión a Fc en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje correspondientes, lo que sugiere que la mutación E345R da como resultado una mayor estabilidad de la interacción Fc-Fc y, en consecuencia, un aumento de la CDC.

Ejemplo 5

Mayor especificidad de la CDC mejorada al combinar E345R con mutaciones inhibitoras complementarias K439E y S440K en una mezcla de dos anticuerpos monoclonales diferentes

Como se describe en el Ejemplo 3, las mutaciones K539E y S440K del anticuerpo contra CD38 005 disminuyeron la eficacia de la CDC como anticuerpos monoclonales. La mezcla de anticuerpos 005 que contenían estas mutaciones restauró la CDC. La CDC eficaz se restringieron así a las células unidas a ambos anticuerpos mutantes simultáneamente. De manera similar, se han encontrado datos para el anticuerpo contra CD20 7D8 descrito en el documento WO 2004/035607 (datos no mostrados).

Puede ser ventajoso restringir la mejora de la inducción de CDC a las células diana que expresan dos antígenos específicos simultáneamente, explotando su expresión combinada para mejorar la selectividad de la inducción de CDC mejorada. También puede ser ventajoso restringir la mejora de la inducción de CDC a las células diana unidas a mezclas de al menos dos anticuerpos diferentes simultáneamente, dichos anticuerpos se unen a un antígeno de la superficie celular de manera idéntica sobre dos epítomos diferentes simultáneamente, o en dos epítomos que presentan competición cruzada, similares o idénticos.

Por lo tanto, para restringir la inducción de CDC mejorada a las células unidas a ambos anticuerpos contra CD20 y CD38, la mutación E345R potenciadora de CDC se combinó con mutaciones inhibitoras de CDC en los anticuerpos 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K y 005-E345R/K439E. Estos anticuerpos se añadieron por separado o se mezclaron a una razón 1:1 en experimentos de CDC como sigue. Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 (también se pueden utilizar otros tipos de células, tales como células Daudi o Raji) en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (concentración final 0,056-10.000 ng/mL en diluciones 1:3) para 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K o 005-E345R/K439E) o mezclas de anticuerpos (concentraciones finales de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo contra CD20 mezclado con 0-333 ng/mL en diluciones 1:3 de anticuerpo contra CD38; o 3,3 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo contra CD38 mezclado con 0,0056-1.000 ng/mL en diluciones 1:3 (anticuerpo contra CD20) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

Se mezcló una serie de concentraciones de anticuerpo 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K con una concentración fija de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo doble mutante 7D8 (concentración máxima con CDC mínima en células Wien133 como agente único según se determina a partir de la **Figura 7A**) para preparar las combinaciones complementarias 005-E345R/K439E + 7D8-E345R/S440K o 005-E345R/S440K + 7D8-E345R/K439E. La **Figura 7C** muestra que los anticuerpos contra CD38 dobles mutantes de 005 indujeron CDC dependiente de la dosis en presencia de una concentración fija del anticuerpo complementario contra CD20 7D8-E345R/K439E o 7D8-E345R/S440K, respectivamente. La eficacia de la CDC por estas combinaciones complementarias (**Figura 7C**) fue comparable al anticuerpo 005-E345R mutante único (potenciador) como agente único (**Figura 7B**). En contraste, en presencia del anticuerpo irrelevante b12, tanto 005-E345R/K439E como 005-E345R/S440K apenas mostraron ninguna CDC en la serie de concentración probada (comparable a 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K como agentes individuales mostrados en **Figura 7B**).

Una serie de concentraciones de anticuerpos 7D8-E345R/K439E o 7D8-E345R/S440K se mezcló con una concentración fija de 3,3 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo doble mutante de 005 (que muestra una CDC pequeña pero limitada en las células Wien133 como agente único según se determina a partir de **Figura 7B**) para preparar las combinaciones complementarias 7D8-E345R/K439E + 005-E345R/S440K o 7D8-E345R/S440K + 005-E345R/K439E. La **Figura 7D** muestra que los anticuerpos contra CD20 dobles mutantes 7D8 indujeron CDC de manera muy eficaz en presencia del anticuerpo complementario contra CD38 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K respectivamente, incluso a las concentraciones más bajas probadas, que se asemejan a no más que unas pocas moléculas de anticuerpos dobles mutantes 7D8 por célula. Para eliminar la contribución del aumento de la densidad de la cola de Fc sobre la membrana celular con respecto a la CDC mejorada observada mediante la mezcla de anticuerpos 7D8 y 005 con mutaciones complementarias K439E y S440K, también se probaron combinaciones de anticuerpos con mutaciones no complementarias. La **Figura 7D** muestra que las combinaciones no complementarias mostraron una eficacia de CDC mucho menor que las combinaciones complementarias, como resultado de una interacción Fc-Fc menos eficaz que las combinaciones complementarias.

Estos datos sugieren que la inducción de CDC (mejorada) por anticuerpos terapéuticos se puede limitar a células que se unen simultáneamente a una mezcla de dos anticuerpos complementarios, en este caso con diferentes especificidades de antígeno, aumentando así la especificidad de la célula diana al requerir la co-expresión de ambos antígenos.

Como se puede observar en las **Figuras 7A y 7B**, 7D8-E345R/K439E, 005-E345R/S440K, 7D8-E345R/S440K y 005-E345R/K439E mostraron una eficacia limitada de CDC en comparación con 7D8-E345R solo. Se observa adicionalmente que la mezcla de 7D8-E345R/K439E y 7D8-E345R/S440K permitió una CDC con una eficacia mejorada en comparación con el anticuerpo 7D8 de tipo salvaje como agente único. Del mismo modo, se observó que la mezcla de 005-E345R/K439E y 005-E345R/S440K permitió una CDC con una eficacia mejorada en comparación con el anticuerpo 005 de tipo salvaje como agente único (datos no mostrados).

Ejemplo 6**Uso de un enfoque de escrutinio de mutantes para identificar mutaciones que estimulan la oligomerización de anticuerpos mediada por la interacción Fc:Fc detectada por un ensayo de CDC**

5 Como se describe en el Ejemplo 3, se identificaron mutaciones de aminoácidos que estimularon CDC para un anticuerpo que reconoce los antígenos diana, CD38, en múltiples líneas celulares que expresan niveles variables de dichos antígenos. Sorprendentemente, la mutación de un solo punto E345R demostró ser suficiente para dotar la lisis celular dependiente de CDC de células Wien133 al anticuerpo 005 anti-CD38, que no logró lisar estas células por CDC en formato IgG1 de tipo salvaje.

10 Otras mutaciones sobre o en la periferia de la interfase Fc:Fc podrían estimular la oligomerización y la CDC de manera análoga. Alternativamente, las mutaciones podrían estimular indirectamente la oligomerización, por ejemplo, induciendo alostéricamente las interacciones Fc:Fc.

15 Para determinar si otras mutaciones de aminoácidos podrían estimular la oligomerización de anticuerpos mediada por Fc, se escrutó una biblioteca de mutantes IgG1-005 anti-CD38 utilizando ensayos de CDC, tanto individualmente como mezclados por pares para seleccionar, por ejemplo, los pares de aminoácidos que interactúan a través de la interfase Fc:Fc. Sin embargo, la misma estrategia se puede aplicar a otros anticuerpos, tales como otra IgG1 o un anticuerpo IgG3.

20 Se generó una biblioteca enfocada de mutaciones en las posiciones indicadas en la Tabla 4. Se introdujeron mutaciones en la región Fc de IgG1-005 utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, EE.UU.). Brevemente, para cada mutación de la posición deseada, se utilizaron un cebador directo e inverso que codificaban un codón degenerado en la ubicación deseada para replicar el molde de ADN plasmídico completo de la cadena pesada de 005 con el alotipo IgG1m(f). Las mezclas de ADN resultantes se digirieron utilizando *DpnI* para eliminar el ADN plasmídico de origen y se utilizaron para transformar *E. coli*. Las colonias resultantes se agruparon y cultivaron, y el ADN plasmídico se aisló de estos grupos y se volvió a transformar en *E. coli* para obtener colonias clonales. El ADN plasmídico mutante aislado de las colonias resultantes se verificó mediante secuenciación de ADN (LGC genomics, Berlín, Alemania). Los casetes de expresión se amplificaron del ADN plasmídico por PCR y las mezclas de ADN que contenían tanto una cadena pesada mutante como una ligera de tipo salvaje IgG1-005 se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectin (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente como describe el fabricante. Se recogieron los sobrenadantes de células transfectadas que contenían anticuerpos mutantes. Los sobrenadantes de anticuerpos mutantes se seleccionaron en ensayos de CDC tanto individualmente como en mezclas por parejas, como sigue.

25 Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Daudi o Wien-133 (se pueden utilizar otros tipos de células, tales como las células Raji) en placas de 96 pocillos de fondo redondo con $1,0 \mu\text{g/mL}$ de anticuerpos no purificados en un volumen total de $100 \mu\text{L}$ durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron $30 \mu\text{L}$ de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 30%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron $10 \mu\text{L}$ de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

30 Las mutaciones descritas en la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6 se seleccionaron para determinar su capacidad para mejorar la oligomerización detectada por la eficacia de la CDC, ya sea como un solo mutante o cuando se mezclan con otros mutantes, por ejemplo, frente a la mutación a través de la interfase Fc:Fc. Opcionalmente, las mutaciones se pueden escrutar adicionalmente para determinar su capacidad para no comprometer FcRn, la unión de la proteína A o la proteína G, ADCC, ADCP u otras funciones efectoras mediadas por el dominio Fc. La combinación de tales mutaciones puntuales estimulantes en un dominio Fc puede estimular aún más la oligomerización y la eficacia de la CDC.

35 Las mutaciones en la región CH2-CH3 incorporadas en el anticuerpo contra CD38 005 se probaron para determinar su capacidad para inhibir la oligomerización según lo determinado por CDC en células Daudi. La lisis del anticuerpo mutante se comparó con 005 de tipo salvaje, para el cual la lisis se ajustó a 100%. El corte para la inhibición se ajustó a una lisis $\leq 66\%$. Al medir de esta manera, la mayoría de las mutaciones probadas inhibieron la CDC (véase la Tabla 4).

40 Las mutaciones en la región CH2-CH3 incorporada en el anticuerpo contra CD38 005 se probaron para determinar su capacidad para potenciar la oligomerización según lo determinado por CDC en células Wien133 (Tabla 5). El anticuerpo contra CD38 005 de tipo salvaje no puede inducir CDC en células Wien133. Los mutantes que exhiben $\geq 39\%$ de lisis celular se puntuaron como potenciadores. De manera completamente inesperada, prácticamente todas las sustituciones obtenidas de los aminoácidos E345 y E430 estimularon la lisis celular por CDC. Para verificar este resultado, los aminoácidos E345, E430 y S440 se sustituyeron con cada posible mutación por mutagénesis dirigida al sitio y se evaluó su capacidad para mejorar la oligomerización según lo determinado por CDC de células Wien133

utilizando un nuevo lote de suero humano, produciendo una lisis ligeramente más eficaz (Tabla 6). Nuevamente, todas las sustituciones de E345 y E430 indujeron CDC eficaces de células Wien133.

5 Las siguientes mutaciones preferidas causaron $\geq 39\%$ de lisis celular de las células Wien133: P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y y S440W.

Tabla 5 Porcentaje de lisos de células Wien-133 en presencia de 1,0 µg/mL de mutaciones puntuales del anticuerpo IgG1-005. IgG1-005 de tipo salvaje lisó 3% de las células en estas condiciones. Cada una de las posiciones individuales que han sido sustituidas por otro aminoácido se proporcionan en la columna izquierda exterior. El aminoácido sustituido para cada posición concreta se proporciona seguido del porcentaje de lisos medido indicado entre paréntesis () en las filas horizontales de las posiciones individuales.

Posición	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)	
P247																	
I253	A (11)	D (9)	K (3)	M (3)	N (3)	R (4)	S (3)	V (51)									
S254	E (14)	F (10)	G (32)	H (2)	I (15)	K (12)	L (65)	P (2)	T (9)	W (9)							
H310	K (3)	W (13)															
Q311	A (9)	C (4)	E (3)	F (19)	G (4)	H (6)	I (28)	K (16)	L (55)	N (6)	P (12)	R (18)	S (9)	T (3)	W (41)	Y (12)	
E345	A (57)	C (22)	F (48)	G (47)	H (49)	I (59)	K (42)	L (72)	M (67)	P (51)	R (64)	S (60)	T (53)	V (67)	W (52)	Y (70)	
D/E356	G (39)	I (31)	L (30)	R (64)	T (32)	V (13)											
T359	G (2)	N (3)	P (4)	R (40)													
E382	F (2)	K (2)	L (44)	M (21)	P (3)	V (53)	W (2)										
G385	D (5)	H (4)	N (18)	Q (4)	R (14)	S (4)	T (4)										
Q386	A (3)	C (4)	D (4)	E (4)	F (3)	G (3)	H (3)	I (4)	K (60)	L (3)	N (4)	P (2)	R (4)	S (3)	T (3)	V (3)	W (3) Y (4)
E430	A (54)	F (68)	G (55)	H (57)	L (58)	P (56)	Q (31)	R (39)	S (20)	V (53)							
N434	D (2)	E (2)	K (2)	R (2)	S (3)	W (18)											
Y436	I (49)	K (3)	L (4)	R (3)	S (3)	T (2)	W (3)										
Q438	E (3)	K (3)	S (2)	T (2)	W (2)	Y (2)											
K439	A (3)	D (2)	H (2)	L (2)	P (2)	T (2)	Y (4)										
S440	A (3)	C (3)	D (6)	E (2)	F (2)	G (3)	I (2)	N (2)	R (2)	T (3)	Y (64)						

Ejemplo 7**Eficacia *in vivo* de IgG1-005-E345R en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de linfoma de células B**

- 5 Se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo IgG1-005-E345R en un modelo subcutáneo con células Raji-luc #2D1. Estas células muestran ~150.000 moléculas CD38 por célula (determinado por análisis QIFIKIT, datos no mostrados) y alta expresión del receptor de defensa del complemento. El protocolo para la inoculación y medición de tumores es básicamente el mismo que el descrito en el Ejemplo 20. El día 0, se inyectaron s.c. 5×10^6 células Raji-luc #2D1 en 200 μ L de PBS en el flanco derecho de ratones SCID. Cuando el volumen tumoral promedio fue de 100 mm^3 (alrededor del día 7), los ratones se clasificaron en grupos (n = 7) y se trataron por inyección i.p. de una dosis única de 500 μ g de anticuerpo por ratón (25 mg/kg). Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 7. Los tumores se midieron hasta un volumen tumoral de punto final de 1500 mm^3 o hasta que los tumores mostraron úlceras o se observaron signos clínicos graves para evitar molestias importantes.
- 10
- 15 La **Figura 8A** muestra el crecimiento tumoral medio el día 21, cuando todos los grupos aún estaban completos. El anticuerpo de tipo salvaje IgG1-005 inhibió ligeramente el crecimiento tumoral, aunque esto no fue estadísticamente significativo. Solo IgG1-005-E345R inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control de anticuerpos irrelevante el día 21 (ANOVA de una vía p <0,05).
- 20 La **Figura 8B** muestra una gráfica de Kaplan-Meier del porcentaje de ratones con tamaños de tumor menores que 500 mm^3 . La formación de tumores se retrasó significativamente en ratones tratados con el anticuerpo IgG1-005-E345R en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 (análisis Mantel-Cox p <0,001) o IgG1-005 de tipo salvaje (p <0,05).
- 25 Estos datos muestran que la introducción de la mutación E345R en el anticuerpo contra CD38 005 dio como resultado una mejora *in vivo* de la actividad antitumoral

Tabla 7: Grupos de tratamiento y dosificación.

Grupo	Anticuerpo	Dosis
1. tipo salvaje	IgG1-005-WT	500 μ g (= 25 mg/kg)
2. Mutante potenciador de CDC	IgG1-005-E345R	500 μ g (= 25 mg/kg)
3. Control de Ab irrelevante	IgG1-b12	500 μ g (= 25 mg/kg)

- 30
- Ejemplo 8**
- La unión a dianas monovalentes mejora adicionalmente la eficacia de la CDC de los anticuerpos E345R**
- 35 Una superficie molecular del anillo hexamérico de IgG1 observada en la estructura cristalina b12 demuestra que por cada IgG en el anillo hexamérico, uno de los dos sitios de unión de C1q está hacia arriba y el otro sitio está hacia abajo de la estructura del anillo, y también un brazo Fab de cada anticuerpo está orientado hacia arriba y uno está orientado hacia abajo, lo que da como resultado que solo un brazo Fab por anticuerpo participe en la unión al antígeno, lo que sugiere la unión monovalente por molécula de anticuerpo en el anillo de anticuerpo hexamérico. La monovalencia podría producir anticuerpos tras la unión del antígeno en una orientación compatible con hexamerización. Para probar esta hipótesis, la eficacia de la CDC de un anticuerpo biespecífico contra CD38/EGFR con la mutación E345R se probó en células Wien133 positivas para CD38 negativas para EGFR, a las que este anticuerpo biespecífico solo puede unirse monovalentemente a través de CD38, y se comparó con la eficacia de la CDC del anticuerpo contra CD38 de unión bivalente, también con la mutación E345R. El anticuerpo monoclonal humano HuMax-EGFr (2F8, descrito en el documento WO 2004/056847) se utilizó como base para los anticuerpos contra EGFR descritos en este ejemplo.
- 40
- 45

- Se generaron anticuerpos biespecíficos *in vitro* de acuerdo con la plataforma DuoBody™, es decir, el intercambio de brazo Fab inducido por 2-MEA como se describe en el documento WO 2011/147986. La base de este método es el uso de dominios CH3 complementarios, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas. Para permitir la producción de anticuerpos biespecíficos por este método, se generaron moléculas de IgG1 que portan ciertas mutaciones en el dominio CH3: en uno de los anticuerpos parentales IgG1, la mutación F405L, en el otro anticuerpo parental IgG1, la mutación K409R. Para generar anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos parentales, cada anticuerpo a una concentración final de 0,5 mg/mL, se incubaron con 2-mercaptoetilamina-HCl 25 mM (2-MEA) en un volumen total de 100 μ L de TE a 37°C durante 90 min. La reacción de reducción se detiene cuando se elimina el agente reductor 2-MEA utilizando columnas de centrifugación (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acuerdo con el protocolo del fabricante.
- 50
- 55

Para el ensayo de CDC, se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 en placas de fondo redondo de 96 pocillos con una serie de concentraciones de anticuerpos (0,01 a 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 9** muestra que, como se esperaba, los anticuerpos contra CD38 sin la mutación E345R (IgG1-005 de tipo salvaje e IgG-b12-K409R x IgG1-005-F405L) no indujeron la destrucción de las células Wien133. Además, el anticuerpo contra EGFR IgG1-2F8-E345R/F405L, que no se unía a las células Wien133 negativas para EGFR (datos no mostrados), no indujo CDC, como se esperaba. La introducción de la mutación K409R no influyó en la capacidad del anticuerpo IgG1-005-E345R para inducir una destrucción de ~60% de las células Wien133 (descrita en el Ejemplo 10). Curiosamente, el anticuerpo biespecífico contra CD38/EGFR IgG1-005-E345R/K409R x IgG1-2F8-E345R/F405L, que solo se puede unir monovalentemente a las células Wien133 positivas para CD38, negativas para EGFR, mostró un aumento de la destrucción máxima de CDC (destrucción de ~60% a ~100%).

Estos datos muestran que el direccionamiento monovalente puede mejorar adicionalmente la capacidad máxima de destrucción de los anticuerpos que contienen la mutación E345R potenciadora de CDC. Además, estos datos muestran que la mutación potenciadora de la oligomerización E345R, medida mediante la mejora de la actividad de la CDC, se puede aplicar a otros formatos de anticuerpos, tales como DuoBody.

Ejemplo 9

La mutación E345R potenciadora de la oligomerización se puede aplicar a otros formatos de anticuerpos tales como DuoBody™

El efecto de la mutación E345R se probó en un anticuerpo biespecífico del formato DuoBody. Los ensayos de CDC se realizaron con anticuerpos biespecíficos contra CD20/CD38 en células Wien133 y Raji positivas para CD20, positivas para CD38.

Se generaron anticuerpos biespecíficos como se describe en el Ejemplo 8. Para el ensayo de CDC, se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos (0,01 a 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 10** muestra que la introducción de la mutación E345R potenciaba la CDC del anticuerpo biespecífico IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R en células Wien 133 (**Figura 10A**) y Raji (**Figura 10B**). Estos datos muestran que la mutación potenciadora de la oligomerización E345R se puede aplicar a otros formatos de anticuerpos para mejorar la actividad de la CDC.

Ejemplo 10

E345R rescata la CDC por el anticuerpo contra EGFR 2F8, que se puede potenciar adicionalmente mediante la unión a una diana monovalente

Como se describe en los Ejemplos 3 y 12, E345R mejoró o rescató la CDC para anticuerpos que reconocen diferentes dianas tumorales hematológicas (CD20 y CD38). Para extender el análisis a un antígeno tumoral sólido, se probó el efecto de E345R sobre la capacidad de la CDC del anticuerpo contra EGFR 2F8 en células de carcinoma epidermoide A431. Además, el efecto del direccionamiento monovalente a EGFR sobre la inducción de CDC mediada por E345R se probó utilizando un anticuerpo contra EGFRxCD20 biespecífico (IgG1-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R) en células A431 positivas para EGFR, negativas para CD20.

Se generaron anticuerpos biespecíficos como se describe en el Ejemplo 8. Para el ensayo de la CDC, se marcaron 5×10^5 células A431/mL con 100 μCi de ^{51}Cr durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en el medio a una concentración de 1×10^5 células/mL. Se incubaron 25.000 células marcadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en diluciones de 1:3) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 μL de dilución de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 25%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 1 hora. Las células se centrifugaron (3 minutos a 300xg) y se añadieron 25 μL de sobrenadante a 100 μL de Microscint en una Optiplate de 96 pocillos de color blanco (PerkinElmer) para su incubación en un agitador (750 rpm) durante 15 minutos. Se determinó la liberación de ^{51}Cr

como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo. La lisis máxima (100%) se determinó mediante el nivel de ^{51}Cr medido en el sobrenadante de células tratadas con Triton X-100. La lisis espontánea fue determinada por el nivel de ^{51}Cr medido en el sobrenadante de células incubadas sin anticuerpo. La lisis celular específica se calculó de acuerdo con la fórmula: $\text{Lisis específica} = 100 \times (\text{cpm muestra} - \text{cpm espont.}) / (\text{cpm máx.} - \text{cpm espont.})$.

La **Figura 11** muestra que IgG1-2F8-E345R/F405L es capaz de lisar células A431 mediante CDC, mientras que el tipo salvaje 2F8 no es capaz de destruir células A431. Estos datos muestran que la actividad de la CDC puede rescatarse en el anticuerpo contra EGFR 2F8 mediante la introducción de la mutación E345R. Esto potencialmente extiende la aplicabilidad de la mutación E345R potenciadora de CDC a anticuerpos dirigidos a antígenos tumorales sólidos.

El anticuerpo biespecífico EGFRxCD20 IgG-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R mostró una mejora adicional de la CDC en las células A431 positivas para EGFR-negativas para CD20.

Estos datos respaldan adicionalmente la hipótesis de que la monovalencia facilita la formación de interacciones Fc-Fc y la posterior inducción de CDC como se postula para un anticuerpo de unión a CD38 descrito en el Ejemplo 8.

Ejemplo 11

E345R mejora o rescata la CDC mediante el anticuerpo contra CD38 003 y los anticuerpos contra CD20 11B8 y rituximab

Como se describe en los Ejemplos 3 y 12, E345R mejora o induce la actividad CDC de varios anticuerpos con diferentes especificidades de diana (CD20, CD38 y EGFR), como se probó en múltiples líneas celulares que expresaban niveles variables de dichos antígenos. Por lo tanto, la introducción de la mutación E345R se consideró un mecanismo general para mejorar o rescatar la CDC para los anticuerpos existentes. Para respaldar esto adicionalmente, se probó el efecto de la mutación E345R sobre la CDC para detectar más anticuerpos con eficacia de CDC intrínseca variable sobre las células Daudi y Wien133: el anticuerpo contra CD38 003, descrito en el documento WO 2006/099875 y los anticuerpos contra CD20 rituximab (tipo I) y 11B8 (tipo II), descritos en el documento WO 2005/103081. Los anticuerpos contra CD20 se pueden dividir en dos subgrupos (Beers et al., *Seminars on Hematology* 47, (2)2010, 107-114). Los anticuerpos tipo I contra CD20 muestran una capacidad notable para activar el complemento y obtener CDC al redistribuir las moléculas de CD20 en la membrana plasmática en balsas lipídicas, que agrupan las regiones Fc del anticuerpo y permiten una mejor unión de C1q. Los anticuerpos tipo II contra CD20 no cambian apreciablemente la distribución de CD20 y, sin la agrupación concomitante, son relativamente ineficaces en la CDC.

Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Daudi o Raji en placas de fondo redondo de 96 pocillos con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen total de 70 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 30 μL de suero humano normal como fuente de C1q (concentración final de 30%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 12** muestra que la mutación E345R mejoró la CDC para todos los anticuerpos probados tanto en células **(A)** Daudi como **(B)** Wien133. Curiosamente, a las concentraciones utilizadas, todos los anticuerpos que no indujeron CDC en el formato de tipo salvaje, indujeron CDC de manera eficaz después de la introducción de la mutación E345R: mAb contra CD38 003 y mAb tipo II contra CD20 11B8 en células Daudi, y mAb contra CD38 005 y 003 y mAb tipo II contra CD20 11B8 en células Wien133. Estos datos sugieren que la mejora de la oligomerización de anticuerpos, más específicamente mediante la introducción de una mutación E345R, es un mecanismo general para mejorar o rescatar la CDC mediante anticuerpos existentes.

Ejemplo 12

E345R mejora la internalización de los anticuerpos del factor tisular

Para probar si la oligomerización mejorada puede inducir una mayor internalización de anticuerpos, se realizaron estudios de co-localización de anticuerpos contra el factor tisular (TF) de tipo salvaje y mutados E345R con el marcador lisosómico LAMP1 mediante microscopía confocal.

Se cultivaron células SK-OV-3 en cubreobjetos de vidrio (espesor 1,5 micras, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) en medio de cultivo de tejidos convencional a 37°C durante 1 día. Las células se incubaron previamente durante 1 hora con 50 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina (Sigma) para bloquear la actividad lisosómica, después de lo cual se añadieron 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo contra el factor tisular (TF) (documento WO 2010/066803). Las células se incubaron durante 1, 3 o 16 horas adicionales a 37°C. Después de eso, las células se lavaron con

PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) con formaldehído al 4% (Klinipath). Los portaobjetos se lavaron con tampón de bloqueo (PBS con un suplemento de saponina al 0,1% [Roche] y BSA al 2% [Roche]) y se incubaron durante 20 minutos con tampón de bloqueo que contenía NH_4Cl 20 mM para sofocar el formaldehído. Los portaobjetos se lavaron nuevamente con tampón de bloqueo y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con un cóctel de anti-CD107a humano de ratón-APC (BD Pharmingen) para identificar LAMP1 lisosomal y anti-IgG humana de cabra-FITC (Jackson) para identificar anticuerpos TF. Los portaobjetos se lavaron nuevamente con tampón de bloqueo y se montaron durante la noche en portaobjetos de microscopio utilizando 20 μl de medio de montaje (6 gramos de glicerol [Sigma] y se disolvieron 2,4 gramos de Mowiol 4-88 [Omnilabo] en 6 mL de agua destilada a la que se añadieron 12 mL de Tris 0,2 M [Sigma] pH 8,5 seguido de incubación durante 10 minutos a 50-60°C; el medio de montaje se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C). Se generaron imágenes de los portaobjetos con un microscopio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado con una lente de objetivo de inmersión en aceite 63x 1,32-0,6 y soporte lógico LAS-AF.

Se analizaron las imágenes TIFF en escala de grises de 12 bits para la co-localización utilizando el soporte lógico MetaMorph® (versión Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, EE.UU.). Las imágenes se importaron como paquetes y se restó el fondo. Se utilizaron configuraciones de umbrales idénticos (configurados manualmente) para todas las imágenes de FITC y todas las imágenes de APC. La co-localización se describió como la intensidad de píxeles de FITC en la región de interés (ROI), donde la ROI está compuesta por todas las regiones positivas para APC. Para comparar diferentes portaobjetos teñidos con diferentes anticuerpos contra TF, las imágenes se normalizaron utilizando la intensidad de píxeles de APC. Se utilizó anti-CD107a humano de ratón-APC para teñir el marcador lisosómico LAMP1 (CD107a). La intensidad de píxeles de LAMP1 no debería diferir entre varios anticuerpos contra TF de los que se habían obtenido imágenes.

Los valores normalizados para la co-localización de FITC y APC se expresan como unidades arbitrarias de acuerdo con la fórmula $[(\text{TPI FITC} \times \text{porcentaje de co-localización})/100] \times [1/\text{TPI APC}]$

$$\text{Porcentaje de co-localización} = \text{TPI FITC que se co-localiza con un píxel de APC} / \text{TPI APC}$$

TPI, intensidad total de píxeles

La **Figura 13** representa la cantidad de intensidad de píxeles de FITC de los anticuerpos contra TF de tipo salvaje y mutados E345R que se solapan con el marcador lisosómico marcado con APC. Para cada anticuerpo o condición probada, se analizaron tres imágenes diferentes de un portaobjetos que contenía ~1, 3 o >5 células. Se observó variación entre las diferentes imágenes dentro de cada portaobjetos. Aun así, era evidente que la mutación E345R para los anticuerpos 011 y 098 produjo un aumento de la co-localización lisosómica después de 1 hora de incubación, en comparación con 011 y 098 de tipo salvaje. Estos resultados indican que la mutación E345R induce una internalización más rápida y una co-localización lisosómica y, por lo tanto, podría potenciar productos conjugados de drogas de anticuerpos.

Ejemplo 13

CDC mejorada por la mutación E345R en rituximab en diferentes líneas de células B con expresión similar de CD20, pero diferentes niveles de proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana

Los Ejemplos 11 y 14 muestran que la eficacia de la CDC del rituximab de tipo salvaje sobre las células Daudi y Wien133 se mejoró al introducir la mutación E345R. Esta eficacia mejorada de la CDC resulta de la estabilización mediada por E345R de las interacciones Fc-Fc. La estructura anular del anticuerpo hexamérico formado concomitantemente sobre la membrana celular diana puede promover la generación eficaz del complejo de ataque a la membrana al facilitar la captura y concentración de componentes del complemento activados cerca de la membrana celular. Como resultado de esta activación eficaz del complemento, los efectos inhibidores de las proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana (mCRP) podrían superarse en parte. La expresión en exceso de las mCRP, tales como CD55, CD46 y CD59, se considera una barrera para la inmunoterapia satisfactoria con anticuerpos anti-tumorales monoclonales (Jurianz et al., Mol Immunol 1999 36:929-39; Fishelson et al., Mol Immunol 2003 40:109-23, Gorter et al., Immunol Today 1999 20:576-82, Zell et al., Clin Exp Immunol. 2007 dic 150 (3):576-84). Por lo tanto, la eficacia de rituximab-E345R se comparó con la de rituximab de tipo salvaje en una serie de líneas de células B con diferentes niveles de las mCRP CD46, CD55 y CD59, pero niveles comparables de la expresión de la diana CD20.

Las líneas de células B Daudi, WIL2-S, WSU-NHL, MEC-2 y ARH-77 expresan cantidades comparables de moléculas CD20 (capacidad de unión a anticuerpos específica 250.000 - sABC) según lo determinado por el análisis QIFIKIT (datos no mostrados). Para comparar los niveles de expresión de proteínas reguladoras del complemento entre estas líneas celulares, se realizó un análisis QIFIKIT para determinar los niveles de CD46 (anti-CD46 humano de ratón, CBL488, clon J4.48 Chemicon), CD55 (anti-CD55 humano de ratón, CBL511, Clon BRIC216, Chemicon) y CD59 (anti- CD59 humano de ratón, MCA1054x, clon MEM-43, Serotec).

Para el ensayo CDC, se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos saturantes (0,002-40,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en diluciones 1:4) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS. La destrucción mediada por CDC máxima se calculó a partir de dos experimentos independientes utilizando los mejores valores de ajuste óptimo de un ajuste no lineal en GraphPad PRISM 5.

La **Figura 14A-D** muestra que la introducción de E345R en rituximab de tipo salvaje dio como resultado una mayor eficacia de la CDC como se observa mediante un aumento de la lisis máxima y una disminución de la CE_{50} para todas las líneas de células B probadas.

La **Figura 14E** muestra que la destrucción mediada por CDC máxima inducida por el mutante rituximab-E345R siempre fue mayor que la del rituximab de tipo salvaje, independientemente de los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana. Estos datos indican que la introducción de E345R aumenta el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales ya que las células tumorales son menos eficaces para evadir el ataque del complemento mediado por anticuerpos por los anticuerpos que contienen E345R.

20 Ejemplo 14

Comparación de la cinética de la CDC para los anticuerpos de tipo salvaje y E345R

Se ha demostrado que la introducción de la mutación E345R estabilizadora de la interacción Fc:Fc mejora o rescata la CDC según lo observado por la disminución de los valores de CE_{50} y el aumento de la lisis máxima para diferentes anticuerpos sobre diferentes líneas celulares descritas en el Ejemplo 3 (anticuerpo contra CD38 005 en Daudi, Raji y Wien133) y en el Ejemplo 11 (anticuerpo contra CD38 003 y anticuerpos contra CD20 rituximab y 11B8 en Daudi y Wien133). A continuación, se analizó la cinética de las reacciones de la CDC para desentrañar adicionalmente la diferencia en la eficacia de la CDC entre los anticuerpos de tipo salvaje y E345R.

Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación (10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante diferentes períodos de tiempo, variando entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 15A** muestra que el anticuerpo contra CD20 IgG1-7D8 de tipo salvaje mostraba una destrucción mediada por CDC máxima de 80% de las células Raji, que ya se alcanzó después de 5 minutos en las condiciones analizadas. Sin embargo, para IgG-7D8-E345R, se observó una destrucción de 80% de las células Raji incluso más rápido, después de 3 min. La lisis máxima por IgG-7D8-E345R (95%) también se alcanzó después de 5 minutos.

La **Figura 15B** muestra que también para el anticuerpo contra CD20 de tipo salvaje rituximab, que es menos potente que 7D8 para inducir CDC en las células Raji utilizadas, la introducción de la mutación E345R dio como resultado una destrucción más rápida de las células diana. El rituximab de tipo salvaje mostró una destrucción mediada por CDC máxima de 32%, que se alcanzó después de 20 minutos. Rituximab-E345R alcanzó 32% de destrucción ya después de aproximadamente 3 minutos y, notablemente, también se alcanzó la lisis máxima por rituximab-E345R (85%) después de 20 minutos.

La **Figura 15C+ D** muestra que las células Raji utilizadas, que son resistentes a la destrucción mediada por CDC por los anticuerpos CD38 de tipo salvaje IgG1-003 e IgG1-005, podrían destruirse rápidamente mediante la introducción de la mutación E345R. IgG1-003-E345R e IgG1-005-E345R mostraron CDC máximas (50% y 60%, respectivamente) ya después de 5 min.

En resumen, los anticuerpos E345R son más potentes que sus contrapartes de tipo salvaje, lo que resulta de una combinación de mayor eficacia (menor CE_{50}), aumento de la lisis máxima y una cinética más rápida de la reacción de CDC.

60 Ejemplo 15

Comparación de la cinética de la CDC para anticuerpos biespecíficos con o sin la mutación E345R

En el ejemplo 9, se describe que la mutación E345R se puede aplicar al anticuerpo biespecífico contra CD38xCD20 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R que fue generado por la plataforma DuoBody, lo que da como resultado una

mayor capacidad de destrucción observada por una disminución de la CE_{50} en ensayos de CDC en células Raji y Wien133. A continuación, se analizó la cinética de la reacción de CDC para desentrañar adicionalmente la diferencia en la eficacia de CDC entre los anticuerpos biespecíficos contra CD38xCD20 con y sin E345R.

5 Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación ($10,0 \mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen total de $100 \mu\text{L}$ durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron $25 \mu\text{L}$ de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, variando entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron $10 \mu\text{L}$ de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

10 La **Figura 16** muestra que el anticuerpo biespecífico IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R indujo una destrucción máxima mediada por CDC de 83%, que se alcanzó después de 10 minutos. La introducción de E345R dio como resultado un aumento de la destrucción máxima por IgG1-005-E345R-F405L x IgG1-7D8-E345R-K409R (98%), que ya se alcanzó después de 2 minutos. Estos datos indican que la introducción de la mutación E345R estabilizadora de Fc-Fc en el anticuerpo biespecífico da como resultado una destrucción acelerada mediada por CDC de las células diana.

20 Ejemplo 16

Comparación de la cinética de la CDC para anticuerpos de unión monovalente con y sin E345R

25 El Ejemplo 8 muestra que la unión a la diana monovalente mejoró adicionalmente la eficacia de la CDC de los anticuerpos E345R como se observa mediante el aumento de la lisis máxima con un anticuerpo biespecífico CD38xEGFR sobre las células Wien133 positivas para CD38 negativas para EGFR. A continuación, se analizó la cinética de la reacción de CDC para desentrañar adicionalmente la diferencia en la capacidad de destrucción mediada por CDC entre anticuerpos de unión monovalente con y sin E345R.

30 Se generaron anticuerpos biespecíficos contra CD38xEGFR y CD20xEGFR, con o sin la mutación E345R *in vitro* de acuerdo con la plataforma DuoBody como se describe en el Ejemplo 8. La eficacia de la CDC de los anticuerpos biespecíficos contra CD38xEGFR se probó en las células Raji positivas para CD38 negativas para EGFR, a las que los anticuerpos biespecíficos solo se pueden unir monovalentemente a través de CD38. Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación ($10,0 \mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen total de $100 \mu\text{L}$ durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron $25 \mu\text{L}$ de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, variando entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron $10 \mu\text{L}$ de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

40 La **Figura 17** muestra que el anticuerpo biespecífico contra CD38xEGFR (IgG1-005-K409R x IgG1-2F8-F405L) indujo una destrucción mediada por CDC máxima de 55%, que se alcanzó después de aproximadamente 10 minutos. La introducción de E345R dio como resultado un aumento de la destrucción máxima (96%), que ya se alcanzó en 5 minutos.

45 La **Figura 17** muestra que el anticuerpo biespecífico contra CD20xEGFR (IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L) indujo una destrucción mediada por CDC máxima de 85%, que se alcanzó después de aproximadamente 5 minutos. Sin embargo, con el anticuerpo contra CD20xEGFR con E345R introducida, se observó una lisis de 85% más rápida, después de 2 minutos. La lisis máxima por el anticuerpo contra CD20xEGFR con E345R (97%) también se alcanzó después de 5 minutos.

50 En resumen, la introducción de la mutación E345R en estos anticuerpos de unión monovalente dio como resultado anticuerpos más potentes, que resultan de una combinación de aumento de la lisis máxima y una cinética más rápida de la reacción de la CDC.

55 Ejemplo 17

CDC mediante una combinación de anticuerpos terapéuticos y E345R/Q386K

60 Como se describe en el Ejemplo 6, los anticuerpos contra CD38 mutantes derivados de IgG1-005 podrían inducir una CDC eficaz sobre células Wien133 cuando la posición E345 del anticuerpo de tipo salvaje fuera sustituida por cualquier aminoácido que no fuera Glutamato (E). Esto sugiere que la oligomerización, como requisito previo de la CDC, se ve obstaculizada por la presencia de la cadena lateral de glutamato en la posición 345 del anticuerpo. Dado que E345 en un Fc está muy cerca de Q386 en el segundo radical Fc enfrentado en la estructura anular de anticuerpo hexamérico, el obstáculo de oligomerización mediada por E345 en un primer anticuerpo podría eliminarse

mediante sustituciones en la posición Q386 de un segundo anticuerpo. Esto permitiría que E345 en el primer anticuerpo interactuara mejor con la posición 386 mutada en el segundo anticuerpo en caso de que ambos anticuerpos se combinaran. Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos de CDC en Wien133, en los que los anticuerpos de tipo salvaje (IgG1-003, IgG1-005 o IgG1-11B8) se mezclaron con IgG1-005-E345R/Q386K o IgG1-005-E345R/Q386K/E430G como ejemplo.

Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de IgG1-005-E345R/Q386K, IgG1-005-E345R/Q386K/E430G sin purificar o anticuerpo de control (0,0001-20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en diluciones múltiples 1:3,33) en presencia o ausencia de 1,0 o 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpos IgG1-003, IgG1-005 o IgG1-11B8 de tipo salvaje en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 18A/B/C** muestra que el anticuerpo contra CD38 IgG1-005-E345R/Q386K indujo la lisis mediada por CDC de células Wien133 de una manera dependiente de la dosis (línea discontinua). La combinación de IgG1-005-E345R/Q386K con 1 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo contra CD38 IgG1-003 de tipo salvaje (**Figura 18A**) o anticuerpo contra CD20 IgG1-11B8 de tipo salvaje (**Figura 18B**) dio como resultado un aumento de la lisis celular máxima. La combinación de IgG1-005-E345R/Q386K con IgG1-005 de tipo salvaje inhibió la CDC de una manera dependiente de la dosis, posiblemente compitiendo por el sitio de unión (**Figura 18C**).

La **Figura 18D/E/F** muestra resultados similares para el anticuerpo contra CD38 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G.

Estos datos indican que los anticuerpos IgG1-003 e IgG1-11B8 de tipo salvaje participaron en la oligomerización de anticuerpos y la activación de CDC cuando se combinaron con IgG1-005-E345R/Q386K o IgG1-005-E345R/Q386K/E430G. En tales combinaciones, el obstáculo de la oligomerización por la posición E345 que está presente en el anticuerpo de tipo salvaje se podría eliminar, al menos en parte, mediante la sustitución Q386K en el anticuerpo mutante. Esta aplicación es particularmente interesante para mejorar las terapias con anticuerpos que son de tipo salvaje en la posición E345, tales como rituximab, ofatumumab, daratumumab o trastuzumab. Además, tales anticuerpos inductores de oligomerización podrían promover la formación de complejos unidos a células con anticuerpos propios del paciente dirigidos contra células diana como células tumorales o bacterias.

El Ejemplo 6 describe múltiples aminoácidos además de E345 que potencian la CDC tras la mutación, por ejemplo, E430 y S440, cuyas mutaciones específicas inducen CDC eficaz sobre células Wien133 cuando se incorporan en el anticuerpo mutante. Con la excepción de los mutantes 1253 e Y436, las mutaciones potenciadoras de la oligomerización identificadas entran en contacto con aminoácidos no mutados en el segundo radical Fc enfrentado de la estructura anular hexamérica. Por lo tanto, se puede esperar que las mutaciones potenciadoras de la oligomerización identificadas, solas o combinadas, también promuevan la oligomerización con anticuerpos no mutados, y se podría lograr una mayor optimización de tales mutantes mediante una estrategia de selección similar a la aplicada en el ejemplo 6.

Ejemplo 18

E345R indujo CDC en los isotipos de anticuerpos IgG2, IgG3 e IgG4

Para probar si la introducción de mutaciones promotoras de la oligomerización puede estimular la actividad CDC de los isotipos de anticuerpos distintos de IgG1, se generaron variantes isotópicas del anticuerpo contra CD38 IgG1-005 con dominios constantes de IgG2, IgG3 o IgG4 humanas que producen IgG2-005, IgG3-005 e IgG4-005 por métodos conocidos en la técnica. Además, se introdujo la mutación E345R potenciadora de la oligomerización en todos estos anticuerpos, produciendo IgG2-005-E345R, IgG3-005-E345R e IgG4-005-E345R. De manera similar, también se generaron IgG2-003 e IgG2-003-E345R a partir del anticuerpo contra CD38 IgG1-003. La eficacia de la CDC de los diferentes isotipos se comparó en un ensayo *in vitro* de CDC.

Se incubaron previamente $0,1 \times 10^6$ células Wien133 en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpos no purificados en un volumen total de 100 μL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. Se añadió IgG1-005-E345R a 3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

La **Figura 19** muestra que IgG2-005, IgG2-003, IgG3-005 e IgG4-005 no pudieron lisar las células (A) Daudi o (B) Wien133 de manera eficaz en las condiciones probadas (la lisis observada de ~20% se consideró como fondo). La introducción de la mutación E345R permitió CDC potentes en las células Daudi por todos los isotipos de IgG

probados. Estos resultados se confirmaron utilizando CDC en células Wien133, aunque IgG3-005-E345R mostró una actividad de CDC limitada con respecto a las otras variantes isotópicas. Estos datos indican que además de IgG1, también se puede aplicar una mutación potenciadora de la oligomerización tal como E345R para promover la actividad CDC de los anticuerpos IgG2, IgG3 e IgG4.

Ejemplo 19

CDC por IgG1-005 e IgG1-005-E345R en un ensayo ex vivo de CDC sobre células de leucemia linfocítica crónica (CLL) de células B positivas para CD38 derivadas de paciente.

Las células primarias criopreservadas de muestras de pacientes con CLL se obtuvieron del biobanco de hematopatología de CDB-IDIBAPS-Hospital Clinic (Dr. Elías Campo, Unidad de Hematopatología, Departamento de Patología, Hospital Clínico, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universidad de Barcelona, Barcelona, España), o de estudios clínicos del Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (NHLBI) (Dr. Adrian Wiestner, NHLBI, Rama de Hematología de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), Bethesda). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes de acuerdo con el Comité de Ética Institucional del Hospital Clínico (Barcelona, España) o la Junta de Revisión Institucional del NIH y la Declaración de Helsinki. Todas las muestras fueron caracterizadas genéticamente e inmunofenotípicamente.

Las muestras de CLL se clasificaron en dos grupos de acuerdo con su expresión de CD38 según lo determinado mediante FACS: se incluyeron cinco muestras en el grupo de alta expresión de CD38 (entre 50% y 98% de la expresión de CD38 en las células Daudi) y se incluyeron cuatro muestras en el grupo de baja expresión de CD38 (entre 0,5% y 3% de la expresión de CD38 en células Daudi).

Las células CLL marcadas fluorescentemente (marcadas con Calceína AM 5 μ M) se incubaron con una serie de concentraciones de anticuerpo (0,01-10 μ g/mL en diluciones de 1:10). A continuación, se añadió suero humano normal a las células opsonizadas con anticuerpos (100.000 células/pocillo) como fuente de complemento (concentración final de 10%) y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se leyó la fluorescencia en un fluorómetro Synergy™ HT como medida para la lisis celular. La destrucción celular se calculó de la siguiente manera:

Lisis específica = $100 \times (\text{lisis de la muestra} - \text{espontánea}) / (\text{lisis máxima} - \text{lisis espontánea})$ donde la lisis máxima se determina mediante una muestra de células tratadas con Tritón al 1%, y la lisis espontánea se determina a partir de una muestra donde las células se incubaron en presencia de NHS al 10% sin anticuerpo.

La **Figura 20** muestra que IgG1-005-E345R mejoró fuertemente la eficacia de CDC en comparación con IgG1-005 de tipo salvaje tanto en células primarias de CLL con alta expresión de CD38 como en células primarias de CLL con baja expresión de CD38.

Ejemplo 20

IgG1-005-E345R/E430G/S440Y forma complejos hexaméricos no covalentes en solución

El triple mutante IgG1-005-E345R/E430G/S440Y se preparó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, EE.UU.). Brevemente, los cebadores directo e inverso que codificaban la mutación deseada E345R se utilizaron para replicar el molde de ADN plasmídico completo que codificaba la cadena pesada IgG1-005 con el alotipo IgG1m(f). La mezcla de ADN resultante se digirió utilizando *DpnI* para eliminar el ADN plasmídico de origen y se utilizó para transformar *E. coli*. El ADN plasmídico mutante aislado de las colonias resultantes se verificó mediante secuenciación de ADN (Agowa, Alemania). La mutación E430G se introdujo en la cadena principal de IgG1-005-E345R utilizando la misma estrategia. La mutación S440Y se introdujo en la cadena principal de IgG1-005-E345R/E430G utilizando la misma estrategia. Las mezclas de ADN plasmídico que codificaba tanto la cadena pesada como la cadena ligera de los anticuerpos se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente según lo descrito por el fabricante. El anticuerpo resultante es un homodímero que contiene la mutación triple E345R/E430G/S440Y en ambas cadenas pesadas.

Los anticuerpos IgG1-005 e IgG1-005-E345R/E430G/S440Y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Los sobrenadantes del cultivo celular se filtraron sobre un filtro frontal de 0,20 μ M, seguido de carga en una columna de proteína A de 5 mL (rProtein A FF, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y elución de la IgG con ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se sometió a diálisis durante la noche con fosfato sódico 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Países Bajos). Después de la diálisis, las muestras se sometieron a filtración en condiciones estériles sobre un filtro frontal de 0,20 μ M. Las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE, PAGE nativa, HP-SEC, dispersión de luz de ángulo múltiple (MALS) y dispersión de luz dinámica (DLS).

La SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras y no reductoras en geles Bis-Tris de NuPAGE 4-12% (Invitrogen, Breda, Países Bajos) utilizando un método de Laemmli modificado (Laemmli 1970 Nature 227(5259): 680-5), donde las muestras migraron a pH neutro. Los geles de SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie y se tomaron imágenes digitales utilizando GeneGenius (Synoptics, Cambridge, Reino Unido). La **Figura 21** muestra que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y mostró un comportamiento típico de los anticuerpos IgG1 con cadenas pesadas y ligeras con puentes disulfuro. Era visible una sola especie molecular con un PM aparente de aproximadamente 150 kDa en condiciones no reductoras, mientras que en condiciones reductoras eran visibles una cadena pesada con un PM aparente de 50 kDa y una cadena ligera de 26 kDa. Los autores de la presente invención llegaron a la conclusión de que, en condiciones de desnaturalización, se forma una molécula monomérica que muestra un comportamiento muy similar a los anticuerpos IgG1 de tipo salvaje.

La PAGE nativa se realizó en condiciones no reductoras utilizando un gel de proteína Sebia Hydragel 15/30 (Westburg, Leusden, Países Bajos), tinción con violeta ácida y se ejecutó en un aparato Hydrasys (Sebia, Vilvoorde, Bélgica). La **Figura 21** muestra que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y migró a una altura similar a la del anticuerpo de control IgG1-b12 no relacionado, aunque un poco más difuso. La tinción difusa observada podría ser causada por la formación de complejos inestables, pero bajo estas condiciones de PAGE, IgG1-005-E345R/E430G/S440Y se comportó predominantemente como una molécula de IgG1 monomérica.

El fraccionamiento mediante HP-SEC se realizó utilizando una unidad de separación Waters Alliance 2975 (Waters, Etten-Leur, Países Bajos) conectada a una columna HP-SEC TSK (G3000SW_x; Toso Biosciences, vía Omnilabo, Breda, Países Bajos), un detector de absorbancia λ doble Waters 2487 (Waters) y una unidad de detección mediante MALS Mini Dawn Treos (Wyatt). Se separaron muestras de 50 μ l que contenían 1,25 μ g/mL de proteína a 1 mL/min en Na₂SO₄ 0,1 M/ fosfato de sodio 0,1 M tamponado a pH 6,8. Los resultados se procesaron utilizando el soporte lógico Empower versión 2002 y se expresaron por pico como porcentaje del área total del pico. La **Figura 22** muestra que >99% de IgG1-005 de tipo salvaje consistió en IgG monomérica intacta, prácticamente sin formarse agregados. La **Figura 23** muestra que el triple mutante IgG1-005-E345R/E430G/S440Y muestra una fracción grande de oligómero que se estimó en 79%, mientras que 21% de la población eluyó en un pico observado en el tiempo de elución esperado para una especie monomérica.

Se muestra una superposición de los perfiles HP-SEC IgG1-005 de tipo salvaje e IgG1-005-E345R/E430G/S440Y en **Figura 24** e ilustra adicionalmente la diferencia de comportamiento entre los dos anticuerpos. IgG1-005-E345R/E430G/S440Y claramente formaron complejos de alto PM, aunque estos complejos parecían ser sensibles a la separación mediante HP-SEC, como lo indica la cantidad significativa de proteína que eluye entre los dos picos. Posiblemente el cizallamiento causado por la separación mediante HP-SEC puede desestabilizar los complejos no covalentes formados por el ensamblaje de monómeros IgG1-005-E345R/E430G/S440Y.

Para evaluar el tamaño del complejo oligomérico observado en la muestra IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, el peso molecular promedio del eluato de HP-SEC se determinó por dispersión de luz de ángulo múltiple (MALS). Mientras que el pico monomérico menor eluyó con un PM promedio aparente de 143 kDa (145,4 kDa esperado), el pico multimérico eluyó con un PM promedio aparente de 772 kDa, o aproximadamente 5,4 subunidades monoméricas. El PM del complejo probablemente se subestima debido a la inestabilidad del complejo en estas condiciones. Por ejemplo, una mezcla de elución simultánea de 88% de especies hexaméricas y 12% de especies monoméricas daría como resultado un tamaño complejo promedio observado de 5,4 unidades de monómero.

Para evaluar el peso molecular aparente en solución, en ausencia del cizallamiento posiblemente inducido por interacciones con la matriz de HP-SEC, se realizó un análisis de dispersión dinámica de luz (DLS). Se analizaron 45 μ l de IgG1-005 filtrado a 0,2 μ M (3,80 mg/mL) o IgG1-005-E345R/E430G/S440Y (2,86 mg/mL) en PBS de pH 7,4 utilizando un aparato DynaPro-801 (Protein Solutions Inc/Wyatt, Dernbach, Alemania) en una cubeta de cuarzo de 100 μ L, registrando veinte mediciones consecutivas por experimento, en tres experimentos independientes. Utilizando el PM de BSA como referencia para la calibración, el PM aparente de IgG1-005 fue de 141,7 kDa (145,4 esperado), mientras que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y mostró un PM de aproximadamente 875,6 kDa, o 6,17 subunidades monoméricas. No se observó ninguna indicación de oligomerización para el anticuerpo IgG1-005, mientras que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y sugirió una formación de complejo altamente eficaz.

En resumen, los datos biofísicos indican que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y mutante forma moléculas similares a IgG1 con puentes disulfuro que son monoméricas, es decir, proteínas dimericas simples, en condiciones desnaturalizantes observadas mediante SDS-PAGE y forman complejos hexaméricos en solución según lo observado mediante DLS. El cizallamiento impuesto mediante PAGE nativa fue suficiente para disociar completamente los complejos, mientras que la HP-SEC desestabilizó parcialmente los complejos predominantemente hexaméricos, como lo indica la presencia de una fracción menor de monómeros.

Ejemplo 21

Ensayos funcionales con IgG1-005, IgG1-005-E345R/E430G/S440Y e IgG1-005-E345R

ELISA de unión a C1q

La unión de C1q a IgG1-005 de tipo salvaje, IgG1-005-E345R-E430G-S440Y triple mutante e IgG1-005-E345R se probó en un ELISA en el que los anticuerpos purificados se inmovilizaron sobre la superficie plástica, provocando la multimerización de anticuerpos aleatorios. Se utilizó suero humano agrupado como fuente de C1q.

Se recubrieron placas para ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) durante la noche a 4°C con una serie de diluciones de los anticuerpos en PBS (intervalo 0,007-25,0 µg/mL en diluciones 1:2,5). Las placas se lavaron y bloquearon con 200 µL/pocillo de 0,5x PBS con un suplemento de Tween 20 al 0,025% y gelatina al 0,1%. Con lavados entre incubaciones, las placas se incubaron secuencialmente con suero humano agrupado al 3% (Sanquin, producto Núm. M0008) durante 1 hora a 37°C, con 100 µL/pocillo de anti-C1q humano de conejo (DAKO, producto Núm. A0136, 1/4.000) durante 1 hora a temperatura ambiente, y con 100 µL/pocillo de anti-IgG de conejo porcino-HRP (DAKO, P0399, 1:10.000) como anticuerpo de detección durante 1 hora a temperatura ambiente. El desarrollo se realizó durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/mL de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido oxálico al 2%. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT). Los datos log transformados se analizaron ajustando curvas de dosis-respuesta sigmoideas con pendiente variable utilizando el soporte lógico GraphPad Prism. A partir de las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis se calcularon los valores de CE50.

La **Figura 25** y la Tabla 8 muestran que IgG1-005-E345R/E430G/S440Y mostró una unión de C1q más eficaz que IgG1-005 WT e IgG1-005-E345R medida mediante ELISA (valor de CE50 más bajo). La eficacia del recubrimiento se probó para los tres anticuerpos y se encontró que era similar (no mostrado).

Tabla 8: CE₅₀ para la unión de C1q en ELISA

Anticuerpo	CE ₅₀ (µg/mL)
IgG1-005-WT	1,551
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	0,52
IgG1-005-E345R	0,836

Ensayo de CDC sobre células Ramos positivas para CD38

Se incubaron previamente 0,1 x 10⁶ células Ramos en placas de fondo redondo de 96 pocillos con una serie de concentraciones de anticuerpos purificados (10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,005, 0,0025, 0,0013, 0,0006 y 0,0003 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 µl de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final de 20%) y se incubaron en una incubadora a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo al poner las placas sobre hielo. Se añadieron 10 µl de yoduro de propidio y la lisis celular se determinó mediante FACS.

Se utilizó un modelo trifásico para ajustar los datos de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y y se calculó el valor medio de CE50 (Tabla 9). IgG1-005-WT e IgG1-005-E345R podrían ajustarse ajustando curvas sigmoideas de dosis-respuesta con pendiente variable. A partir de la curva de respuesta a la dosis sigmoidea se calculó el valor de CE50 (Tabla 9). Se utilizó el soporte lógico GraphPad Prism para ajustar los datos (Figura 26). IgG1-005-E345R/E430G/S440Y mostró una mayor actividad de CDC en comparación con los anticuerpos IgG1-005 e IgG1-005-E345R de tipo salvaje sobre células Ramos. El modelo trifásico de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y puede explicarse por el hecho de que a bajas concentraciones (entre 0,0003 y 0,03 µg/mL) los anticuerpos dentro de un hexámero estable no tienen que unirse a una diana para inducir CDC eficaz. Efectivamente, los sitios de unión a C1q de la superficie celular se crean mediante la unión de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y ya a bajas concentraciones de anticuerpos, debido a que no es necesaria la agrupación de antígenos para la hexamerización de anticuerpos.

Tabla 9: CE50 para CDC

Anticuerpo	CE ₅₀ (µg/mL)
IgG1-005-WT	0,116
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	0,005 (CE50 media)
IgG1-005-E345R	0,026

Ensayo informador de ADCC utilizando células Raji positivas para CD38

La actividad ADCC de los anticuerpos anti-CD38 opsonizados en la célula diana Raji se midió utilizando un ensayo

indicador bioluminiscente de ADCC (Promega Madison, WI, EE.UU.) en el que se cuantifica la activación de la ruta biológica en las células efectoras.

5 El ensayo informador utiliza como células efectoras células Jurkat transfectadas de manera estable con el gen para el receptor FcγRIIIa, la variante V158 (alta afinidad) y el gen informador de luciferasa de luciérnaga clonado después de un elemento de respuesta NFAT (factor nuclear de células T activadas) que impulsa la expresión de luciferasa. La unión del anticuerpo al receptor FcγRIIIa en las células efectoras induce la transcripción génica mediada por NFAT y, por lo tanto, la expresión de luciferasa, que se cuantifica mediante lectura de luminiscencia. Las células Raji se incubaron con una serie de concentraciones de anticuerpos purificados (250, 71,4, 20,4, 5,8, 1,7 y 0,5 ng/mL). Para obtener una descripción más detallada de los materiales y métodos véase el manual técnico proporcionado por Promega. IgG1-005-E345R/E430G/S440Y indujo la activación de la vía NFAT después del acoplamiento del receptor FcγRIIIa. La **Figura 27** muestra que las células Raji opsonizadas con IgG1-005-E345R/E430G/S440Y indujeron la activación de las células efectoras mediada por FcγRIIIa como se midió en el ensayo referido. El valor de CE50 para IgG1-005-E345R/E430G/S440Y fue mayor que para IgG1-005 de tipo salvaje e IgG1-005-E345R (Tabla 10). Sin embargo, la señal máxima para IgG1-005-E345R/E430G/S440Y fue mayor que para IgG1-005 de tipo salvaje e IgG1-005-E345R (Tabla 10).

Tabla 10: CE50 y señal máxima para el ensayo informador de ADCC

Anticuerpo	CE ₅₀ (ng/mL)	Señal máxima (URL)
IgG1-005-WT	9,5	334878
IgG1-005-E345R/E430G/S440Y	36	393802
IgG1-005-E345R	4,7	172293

20 Ejemplo 22

Análisis farmacocinético (PK) de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y en comparación con IgG1-005 de tipo salvaje

25 Los ratones en este estudio se alojaron en una unidad de barrera de la Instalación Central de Animales de Laboratorio (Utrecht, Países Bajos) y se mantuvieron en jaulas con filtro y agua y alimentos proporcionados ad libitum. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht. A los ratones SCID (C.B-17/lcrCrl-scid-BR, Charles-River) se les inyectaron por vía intravenosa 500 µg de anticuerpo (IgG1-005 de tipo salvaje o IgG1-005-E345R/E430G/S440Y) utilizando 3 ratones por grupo.

30 Se recogieron muestras de sangre de 50 µL de la vena safena 10 minutos, 4 horas, 1 día, 2 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la administración de los anticuerpos. Se recogió sangre en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 g. El plasma se almacenó a -20°C hasta la determinación de las concentraciones de anticuerpos.

35 Se determinaron las concentraciones específicas de IgG humana utilizando un ELISA sándwich para hIgG total y específico para CD38. Para el ELISA de hIgG total, se utilizó el clon de mAb anti-IgG-kappa humano de ratón MH16 (# M1268, CLB Sanquin, Países Bajos), aplicado como recubrimiento a placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL como anticuerpo de captura. Después de bloquear las placas con PBS con un suplemento de albúmina de suero bovino al 0,2%, se añadieron las muestras, tampón ELISA diluido seriadamente (PBS con un suplemento de Tween 20 al 0,05% y albúmina de suero bovino al 0,2%), y se incubaron en un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Las placas se incubaron posteriormente con anti-inmunoglobulina IgG humana de cabra (# 109-035-098, Jackson, West Grace, PA) y se desarrollaron con 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm. Para el ELISA específico de CD38, el dominio extracelular CD38 marcado con His se aplicó como recubrimiento a placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL. Después de bloquear las placas con tampón ELISA, se añadieron muestras diluidas seriadamente con tampón para ELISA, y se incubaron en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, las placas se incubaron con 30 ng/mL de anti-IgG1 humana de ratón-HRP (Sanquin M1328, clon MH161-1) y se desarrollaron con 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

55 La **Figura 28** muestra que las concentraciones plasmáticas de IgG humana fueron considerablemente más bajas para el mutante IgG1-005-E345R/E430G/S440Y que para IgG1-005 de tipo salvaje en todos los puntos de tiempo probados. La **Figura 29** muestra que la tasa de aclaramiento de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y fue aproximadamente 50 veces mayor que la de IgG1-005 WT.

Ejemplo 23

El estado oligomérico de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y se puede controlar mediante la composición del tampón

El fraccionamiento mediante HP-SEC de los anticuerpos IgG1-005 e IgG1-005-E345R/E430G/S440Y se realizó utilizando una unidad de separación Waters Alliance 2975 (Waters, Etten-Leur, Países Bajos) conectada a una columna HP-SEC TSK (G3000SW_{xl}; Toso Biosciences, a través de Omnilabo, Breda, Países Bajos), un detector de absorbancia λ doble Waters 2487 (Waters) y una unidad de detección MALS Mini Dawn Treos (Wyatt). Se separaron muestras de 50 μ L que contenían 1,0 μ g/mL de proteína a 1 mL/min en diferentes condiciones de tampón. Los resultados se procesaron con el soporte lógico Empower versión 2002 y se expresaron por pico como porcentaje del área total del pico.

La **Figura 30** muestra los perfiles de elución HP-SEC registrados en Na₂SO₄ 0.1 M/ fosfato de sodio 0,1 M tamponado a pH 6,8. A pH 6,8, >99% de los anticuerpos IgG1-005 de tipo salvaje eluyeron como especies monoméricas. En contraste, el perfil de HP-SEC de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y en este tampón mostrado en la **Figura 31** muestra una fracción oligomérica de 77%, mientras que 23% de la población eluyó como una especie monomérica. Como se describe en el Ejemplo 19, la fracción menor restante de monómero podría ser causada por la disociación inducida por la columna, ya que no se observó ningún rastro de monómero IgG1-005-E345R/E430G/S440Y durante el análisis en modo discontinuo utilizando dispersión de luz dinámica en estas condiciones.

La **Figura 32** muestra una superposición de los perfiles de elución de HP-SEC de IgG1-005 registrados en NaCl 0,15 M/citrato 0,1 M tamponado a pH 6,8 (línea discontinua) y pH 5,0 (línea continua). El perfil de HP-SEC de IgG1-005 en tampón de citrato tanto a pH 6,8 como a pH 5,0 fue muy comparable al comportamiento en tampón de fosfato a pH 6,8, eluyendo >99% de la proteína como especies monoméricas.

La **Figura 33** muestra una superposición de los perfiles de elución de HP-SEC de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y registrados en NaCl 0,15 M/citrato 0,1 M tamponado a pH 6,8 (línea discontinua) y pH 5,0 (línea continua). De acuerdo con el comportamiento en fosfato a pH 6,8, en citrato a pH 6,8 el anticuerpo mostró 84% de oligomerización. En marcado contraste, la disminución del pH a 5,0 revirtió drásticamente la oligomerización de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y. La fracción multimérica cayó a menos de 1%, eluyendo >99% de la proteína como una especie monomérica. El desensamblaje de los oligómeros fue específico para condiciones de pH bajo y no fue causado por el uso de citrato como un componente de tampón, como lo demuestra la oligomerización eficaz en citrato tamponado a pH 6,8.

En resumen, la reducción del pH de 6,8 a 5,0 es suficiente para desensamblar completamente los hexámeros de anticuerpos en fase de solución, un efecto que podría explicarse por la modificación de la carga de los aminoácidos de histidina presentes en la interfase Fc:Fc crucial para el ensamblaje de anticuerpos hexaméricos. Además, este comportamiento fue específico para las variantes de anticuerpos que contenían mutaciones que inducían el autoensamblaje mediado por Fc, como IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, mientras que los anticuerpos de tipo salvaje permanecieron monoméricos a ambos niveles de pH.

Ejemplo 24

La introducción de las mutaciones hexaméricas estables para Fc-Fc E345R/E430G/S440Y dará como resultado una mayor actividad bactericida de los anticuerpos IgG contra las bacterias que expresan proteínas de superficie de unión a Fc.

El sistema de cascada del complemento es un mecanismo de defensa del anfitrión importante contra los patógenos y se puede dividir en tres rutas de activación diferentes para reconocer patógenos: i) la vía clásica mediada por anticuerpos, que se activa al unirse C1q al anticuerpo unido al patógeno, ii) la lectina y iii) la vía alternativa, en la cual el sistema del complemento reconoce directamente y es activado por el patógeno en ausencia de anticuerpos. Las tres vías convergen en la etapa de escisión de C3 y depósito de C3b. Los microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos de evasión del complemento, uno de los cuales está mediado por la Proteína A [Joiner Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:201-30; Foster Nat Rev Microbiol (2005) diciembre; 3(12):948-58]. La Proteína A se identificó por primera vez en la pared celular de *Staphylococcus aureus* y es bien conocida por su unión a la región Fc de IgG (Deisenhofer et al., Biochem (1981) 20, 2361-70; Uhlen et al., J. Biol. Chem (1984) 259,1695-1702) Hasta ahora, el efecto antifagocítico de la Proteína A y su papel en la patogénesis de *S. aureus* fue explicado por la interacción entre la Proteína A y la IgG, lo que da como resultado una orientación incorrecta de anticuerpos para que sea reconocido por el receptor de Fc de neutrófilos (Foster Nat Rev Microbiol (2005) diciembre; 3(12):948-58). En el ejemplo 4, se demostró que la CDC mediada por anticuerpos IgG1 específicos de células B fue inhibida por el péptido DCAWHLGELVWCT que competía por la unión a Fc. El péptido se dirige al sitio de unión consenso en Fc de IgG que coincide con el sitio de unión para la Proteína A, la Proteína G y el factor reumatoide (Delano et al., Science 2000 18 de febrero; 287(5456):1279-83). Basándose en estos datos, se especuló que el mecanismo de evasión del complemento bacteriano mediado por Proteína A podría funcionar compitiendo por la unión a Fc, lo que daría como

resultado la desestabilización de la interacción Fc-Fc de un anticuerpo específico del microbio y, en consecuencia, la inhibición de la activación del complemento mediada por anticuerpos. Además, en el ejemplo 4, también se demostró que los anticuerpos IgG1 específicos de células B que contienen la mutación E345R potenciadora de CDC eran menos sensibles a la inhibición de la CDC por el péptido DCAWHLGELVWCT que competía por la unión a Fc que los anticuerpos de tipo salvaje parentales. Al extrapolar estos resultados a las proteínas de unión a Fc expresadas en microbios, el aumento de la estabilización de las interacciones Fc-Fc de IgG1 por la mutación E345R haría que los anticuerpos específicos de microbios fueran menos propensos a la inhibición del complemento mediante una estrategia de escape del patógeno a través de la competición por la unión a Fc de las proteínas de la superficie microbiana, tales como la proteína A. En consecuencia, la introducción de la mutación E345R en los anticuerpos IgG dirigidos contra una bacteria daría como resultado un aumento del depósito de C3b en las bacterias y una mayor actividad bactericida en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje parentales. Se espera que un hexámero estabilizado (IgG-E345R/E430G/S440Y) que ya esté oligomerizado antes de unirse a una diana microbiana sea adicionalmente resistente a, p. ej., la unión a la Proteína A que los anticuerpos IgG que contienen la mutación E345R única. En consecuencia, la introducción de las mutaciones E345R/E430G/S440Y en anticuerpos IgG dirigidos contra microbios daría como resultado un aumento del depósito de C3b en los microbios y una mayor actividad microbiana en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje parentales.

Para probar si la oligomerización de IgG1-005-E345R/E430/S440Y puede inhibir la unión a la proteína A, las preparaciones proteicas purificadas de IgG1-005 e IgG1-005-E345R/E430/S440Y se analizaron mediante dos métodos ortogonales:

- 1) Determinación de la concentración de IgG midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Países Bajos).
- 2) Determinación de la concentración de IgG utilizando un aparato Octet QK (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.), Diluyente de Muestras Octet y utilizando las puntas sensoras para proteína A listas para su uso (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.) en comparación directa con una curva de referencia patrón de IgG (Siemens).

Al determinar la razón entre la concentración determinada por A280 sobre la concentración determinada utilizando Octet-Proteína A, se observó que IgG1-005-E345R/E430/S440Y es de hecho menos propenso a unirse a la Proteína A que IgG1-005 (tabla 11).

Tabla 11: Concentraciones de anticuerpos mediante absorbancia a 280 nm y Octet-Proteína A

Anticuerpo	A280 (µg/mL)	Octet-Proteína A (µg/mL)	A280/Proteína A x 100 (%)
IgG1-005-E345R-E430G-S440Y	2905	2052,5	71%
IgG1-005	3818	3619,6	95%

Como una medida *in vitro* para la destrucción bacteriana mediada por el complemento, se determinaron tanto la fagocitosis por neutrófilos como la generación de C3a en el plasma, que coinciden con el depósito de C3b en la bacteria. De hecho, se ha descrito que el depósito de C3b en *S. aureus* da como resultado una fagocitosis mejorada y se correlaciona con la destrucción bacteriana (Rooijackers et. al., Nature Immunology 2005: 6, 920-927).

S. aureus se marcará con FITC incubando un cultivo bacteriano de crecimiento exponencial con 100 µg/mL de FITC durante 1 hora a 37°C en tampón de carbonato 0,1 M (pH 9,6). Las células polimorfonucleares humanas (PMN) se aislarán utilizando un gradiente de Ficoll. Las bacterias marcadas con FITC se opsonizarán con una serie de concentraciones de anticuerpos específicos con o sin la mutación E345R/E430G/S440Y. Se realizará una fagocitosis *in vitro* incubando 1×10^8 bacterias opsonizadas marcadas con FITC con PMN humanas en presencia de suero empobrecido en IgG al 25% como fuente de complemento durante 25 minutos a 37°C en un volumen total de 200 µL bajo agitación vigorosa. Las células se fijarán y los eritrocitos se lisarán por incubación con solución de lisis BD FACS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, la fagocitosis se medirá mediante FACS. La población de neutrófilos se seleccionará a través de la dispersión frontal y lateral y la fagocitosis se expresará como la fluorescencia media en la población de neutrófilos. Alternativamente, la generación de C3a se medirá en las muestras mediante ELISA como medida para la activación del complemento y el depósito de C3b.

Se espera que los anticuerpos específicos de *S. aureus* que contienen la mutación E345R/E430G/S440Y induzcan más activación del complemento y fagocitosis por parte de los neutrófilos que los anticuerpos parentales de tipo salvaje. Un ejemplo de un anticuerpo que se podría utilizar en tales experimentos es la IgG1 monoclonal quimérica pagibaximab (BSYX-A110; Biosynexus), que se dirige al ácido lipoteicoico (LTA) que está incluido en la pared celular de los estafilococos (Baker, Nat Biotechnol. 2006 dic; 24 (12):1491-3; Weisman et al., Int Immunopharmacol. mayo de 2009; 9(5):639-44).

Ejemplo 25

La formación de complejos de IgG hexaméricos no covalentes mediante la introducción de la mutación triple E345R/E430G/S440Y se produce independientemente del dominio Fab.

Se demostró la formación en solución de complejos de anticuerpos hexaméricos unidos no covalentemente mediante la introducción de la mutación triple E345R/E430G/S440Y (RGY) para el anticuerpo contra CD38 005 en el Ejemplo 20. En este experimento, la formación de complejos de IgG hexaméricos no covalentes de otros anticuerpos IgG1 humanos que difieren en sus dominios Fab: anticuerpos contra CD20 7D8 y rituximab, anticuerpo contra EGFR 2F8 y anticuerpo contra manano de *C. albicans* M1g1. La generación y purificación de los anticuerpos triples mutantes y los análisis HP-SEC se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 20.

La **Figura 34** muestra que todos los anticuerpos triples mutantes mostraron una fracción grande de oligómero: IgG1-7D8-RGY (67,2%) (Figura 34A), IgG1-ritux-RGY (83,6%) (Figura 34B), IgG1-2F8-RGY (74,5%) (Figura 34C) e IgG1-M1-RGY (74,5%) (Figura 34D). Estos datos indican que el concepto de E345R/E430G/S440Y para inducir el autoensamblaje de anticuerpos en hexámeros en solución se puede aplicar generalmente a secuencias de IgG1, independientemente de la estructura primaria del dominio Fab.

Ejemplo 26

CDC por anticuerpos CD20 que contienen la mutación triple E345R/E430G/S440Y en un ensayo CDC ex vivo en células CLL positivas para CD20 derivadas de pacientes.

Las células B de CLL PB CD19+/CD5+ congeladas (Recidivantes/Refractarias) aisladas de células mononucleares de sangre periférica de CLL se adquirieron de Allicells, Emeryville, CA. La CDC se realizó como se describe en el Ejemplo 21, con la excepción de que se utilizaron 20.000 células por placa de 96 pocillos. Se determinó la expresión de CD20 como una Capacidad de Unión a Anticuerpos Específica (sABC) 39.000 mediante QIFIKIT, Dako, Glostrup, Dinamarca. La **Figura 35** muestra que los anticuerpos CD20 que contienen la mutación triple E345R/E430G/S440Y mostraron actividad CDC funcional en células de CLL primarias positivas para CD20. La introducción de la mutación E345R/E430G/S440Y dio como resultado una destrucción mediada por CDC más eficaz (CE50 inferior) de células de CLL primarias por 7D8 (Figura 35A) y permitió una CDC potente por rituximab, que no mostró ninguna actividad de destrucción en el formato WT (Figura 35B).

Ejemplo 27

La introducción de la mutación triple E345R/E430G/S440Y para la inducción de hexamerización y el aumento de CDC se pueden aplicar a diferentes isotipos de anticuerpos.

Las variantes isotópicas del anticuerpo contra CD38 IgG1-005 se generaron con dominios constantes de IgG2, IgG3 o IgG4 humanas que producen IgG2-005, IgG3-005 e IgG4-005 por métodos conocidos en la técnica. Además, la mutación triple E345R/E430G/S440Y se introdujo en todos estos anticuerpos, produciendo IgG2-005-RGY, IgG3-005-RGY e IgG4-005-RGY.

El análisis HP-SEC de los diferentes isotipos se realizó como se describe en el Ejemplo 20.

La **Figura 36** muestra que las isoformas probadas que contienen la mutación triple E345R/E430G/S440Y formaron complejos hexaméricos en solución: IgG1-005-RGY (79,2% multimérico) (Figura 36A), IgG2-005-RGY (46,1% multimérico) (Figura 36B), IgG3-005-RGY (37,8% multimérico) (Figura 36C) e IgG4-005-RGY (84,4% multimérico) (Figura 36D).

La eficacia de la CDC de los diferentes isotipos se comparó probando series de concentración de anticuerpos no purificados (0,0003-10 µg/mL en diluciones de 1:2) en un ensayo de CDC in vitro como se describe en el Ejemplo 18. La **Figura 37** muestra que la introducción de la triple mutación RGY permitía una CDC potente sobre células Daudi (Figura 37A) por todos los isotipos de IgG probados. Estos resultados se confirmaron utilizando CDC sobre células Wien133 (Figura 37B), aunque IgG3-005-RGY mostró una actividad CDC limitada con respecto a otras variantes isotópicas. Estos datos para los mutantes triples RGY son similares a los mostrados para los mutantes E345R en el Ejemplo 18, Figura 19.

Ejemplo 28

Combinaciones de mutaciones para inducir la formación de complejos oligoméricos no covalentes en solución.

El ejemplo 20 describe que el anticuerpo IgG1-005 que contiene las tres mutaciones E345R, E430G y S440Y (RGY) forma complejos oligoméricos en solución. Los anticuerpos que contienen variantes de esta triple mutación con una sustitución de aminoácidos en cualquiera de estas tres posiciones se probaron para determinar su capacidad para

formar complejos oligoméricos en solución. Como ejemplo de la clase de posibles sustituciones E345R, que consiste en E345 a A/C/D/F/G/H/I/K/L/M/N/P/Q/R/S/T/V/W/Y, E345K se probó combinada con E430G/S440Y. Como ejemplo de la clase de posibles sustituciones E430G, que consiste en E430 a A/C/D/F/G/H/I/K/L/M/N/P/Q/R/S/T/V/W/Y, E430S se probó combinada con E345R/S440Y. La clase de posibles sustituciones de S440Y consiste en proteínas con un aminoácido en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en S440, Y436, D/E356, T359, E382, N434, Q438, I253 y S254, que es Y o W; no Y; no D ni E; no T; no E; no N; no Q; no I; y no S, para cada posición, respectivamente. Como ejemplo de esta clase de sustituciones S440Y, Y436I y S440W se probaron combinadas con E345R/E430G. Las combinaciones de mutaciones E345K/E430G/S440Y (designada RGY), E345R/E430S/S440Y (designada RSY), E345R/E430G/S440W (designada RGW) o E345R/E430G/Y436I (designada RGI) se introdujeron en el anticuerpo contra CD38 IgG1 005 por métodos conocidos en la técnica, produciendo IgG1-005-KGY, IgG1-005-RSY, IgG1-005-RGW e IgG1-005-RGI, respectivamente.

El análisis mediante HP-SEC se realizó como se describe en el Ejemplo 20. La **Figura 38** muestra que de manera similar a IgG1-005-RGY (Ejemplo 20, Figura 23), IgG1-005-KGY (Figura 38A), IgG1-005-RSY (Figura 38B) e IgG1-005-RGW (Figura 38C) formaron complejos oligoméricos en solución con eficacia variable. Para los mutantes IgG1-005-KGY e IgG1-005-RGW, la señal A280 observada que migra entre los picos de oligómero y monómero sugiere que el método HP-SEC puede contribuir a la desestabilización de los complejos oligoméricos, como se describe en el Ejemplo 20.

La eficacia de la CDC de los anticuerpos se comparó probando series de concentraciones de anticuerpos no purificados (0,0003-10 µg/mL en diluciones de 1:3) en un ensayo de CDC in vitro como se describe en el Ejemplo 18. La **Figura 39A** muestra que todas las combinaciones de triple mutación probadas dotaron a IgG-005 de la capacidad de destruir células Wien133 en un ensayo de CDC in vitro, donde IgG-005 de tipo salvaje no muestra ninguna destrucción. La **Figura 39B** muestra que también las células Ramos fueron destruidas de manera más eficaz por los anticuerpos triples mutantes probados en comparación con IgG1-005 de tipo salvaje.

Estos datos muestran que la oligomerización en solución y/o la inducción de CDC pueden ser inducidas por IgG1-005-KGY, IgG1-005-RSY, IgG1-005-RGW e IgG1-005-RGI, lo que sugiere que las mutaciones seleccionadas de cualquier posible sustitución E345R de aminoácido de origen natural, y cualquier posible sustitución E430G de aminoácido de origen natural, o los aminoácidos triptófano o tirosina pueden ser posibles sustituciones de aminoácidos para S440, pueden sustituir E345R, E430G y S440Y, respectivamente. Además, los datos de HP-SEC sugieren que tales sustituciones pueden modular la fuerza de interacción entre las subunidades de polipéptidos que contienen Fc del complejo oligomérico.

Ejemplo 29

Los anticuerpos que contienen mutaciones triples E345R/E430G/S440Y se pueden ensamblar en anillos heterooligoméricos

El ejemplo 5, la Figura 7 demuestran que los anticuerpos que contienen una de las dos mutaciones complementarias K439E o S440K, ilustradas en la Figura 4, se inhiben en su actividad CDC, mientras que pueden formar complejos capaces de activar la CDC cuando se mezclan. El ejemplo 20 describe la construcción del anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y (aquí denominado IgG1-005-RGY), que formó complejos oligoméricos, probablemente hexaméricos, en solución, que también mostraron una mayor actividad CDC en comparación con IgG1-005 de tipo salvaje (Ejemplo 21, Figura 26). El ejemplo 28 describe que también IgG1-005-KGY, IgG1-005-RSY, IgG1-005-RGW e IgG-005-RGI mostraron mayores CDC en comparación con IgG1-005. Para probar si la oligomerización en fase de solución podría restringirse a mezclas de anticuerpos que no interactúan entre sí, se generaron variantes de anticuerpos de IgG1-005-RGY que contenían cada una una de las dos mutaciones complementarias K439E o S440K que prohibían la auto-oligomerización.

La mutación K439E se introdujo en IgG1-005-E345R/E430G/S440Y por métodos conocidos en la técnica, produciendo IgG1-005-E345R/E430G/K439E/S440Y (IgG1-005-RGEY). La mutación S440K se introdujo en IgG1-005-E345R/E430G por métodos conocidos en la técnica, produciendo IgG1-005-E345R/E430G/S440K (IgG1-005-RGK). Las mutaciones Y436I y S440K se introdujeron en IgG1-005-E345R/E430G por métodos conocidos en la técnica, produciendo IgG1-005-E345R/E430G/Y436I/S440K (IgG1-005-RGIK). La razón para incluir Y436I en IgG1-005-RGIK fue compensar la ausencia de la mutación potenciadora de oligomerización S440Y.

El análisis mediante HP-SEC de las diferentes variantes de anticuerpos y mezclas de anticuerpos equimolares se realizó como se describe en el Ejemplo 20, pero utilizando PBS (fosfato de sodio 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4; B. Braun, Oss, Países Bajos) como fase móvil. La **Figura 40** muestra que la introducción de K439E en IgG1-005-RGY prohibió la auto-oligomerización de IgG1-005-RGEY (2,7% multímeros). Del mismo modo, la sustitución de S440Y en IgG1-005-RGY con la mutación S440K prohibió la auto-oligomerización de IgG1-005-RGK (2,2% multímeros). Sorprendentemente, una mezcla de monómeros en fase de solución (es decir, anticuerpos diméricos únicos) IgG1-005-RGEY más IgG1-005-RGK formó especies oligoméricas con una movilidad en HP-SEC equivalente a la de

IgG1-005-RGY (65% multímeros), aunque con menor eficacia que IgG1-005-RGY (84% multímeros).

La **Figura 41** muestra que la introducción de Y436I más S440K en IgG1-005-E345R/E430G prohibió la auto-oligomerización de IgG1-005-RGIK (1,8% multímeros). Nuevamente, una mezcla de la solución monomérica IgG1-005-RGEY más IgG1-005-RGIK en fase de solución formó especies oligoméricas con una movilidad en HP-SEC equivalente a la de IgG1-005-RGY, pero ahora con alta eficacia (93% multímeros).

La **Figura 42** muestra una comparación directa de la mezcla IgG1-005-RGEY más IgG1-005-RGK con la mezcla IgG1-005-RGEY más IgG1-005-RGIK, lo que demuestra que IgG1-005-RGIK (65% multímeros) podría inducir oligomerización heteromérica con IgG1-005-RGEY más eficazmente que IgG1-005-RGK (93% multímeros). La presencia de la oligomerización extra y la mutación potenciadora de CDC Y436I en IgG1-005-RGIK aparentemente estabilizó la formación de complejos con IgG1-005-E345R/E430G/K439E/S440Y.

En resumen, los anticuerpos IgG1-005 que contienen mutaciones E345R/E430G y las mutaciones inhibitoras de la auto-oligomerización adicionales K439E/S440Y, o S440K, o Y436I/S440K, se podrían volver a ensamblar en complejos multiméricos, mezclando moléculas de anticuerpos con mutaciones complementarias (K439E en un anticuerpo, S440K en el otro).

Ejemplo 30

Los fragmentos Fc pueden reclutarse a la superficie celular mediante anticuerpos de unión celular, si ambos componentes contienen las mutaciones triples E345R/E430G/S440Y

Las tres mutaciones E345R, E430G y S440Y se introdujeron en un fragmento Fc de IgG1m(f) por métodos conocidos en la técnica, creando Fc-RGY. La proteína se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 20. El análisis mediante HP-SEC de la muestra Fc-RGY se realizó como se describe en el Ejemplo 20. La **Figura 43** muestra que bajo las condiciones de HP-SEC utilizadas, Fc-RGY mostró aproximadamente 28% de monómeros y 72% de oligómeros distribuidos en múltiples estados, medidos por la fracción del área del pico con respecto al área total.

A continuación se probó si los fragmentos Fc-RGY podían reclutarse en complejos oligoméricos con anticuerpos IgG1-RGY en solución. Por lo tanto, se mezclaron 1:1 6 µg/mL de Fc-RGY marcado con Alexa-647 (Fc-RGY-A647) con una serie de concentraciones (0,001-3 µg/mL en diluciones de 1:3) de un anticuerpo específico para EGFR o específico para CD20. Inmediatamente después de mezclar, las muestras se añadieron a $0,1 \times 10^6$ células A431 positivas para EGFR o Daudi positivas para CD20 y se incubaron durante 45 minutos a 4°C. Después de lavar las células dos veces con RPMI1640/BSA al 0,1% (3 minutos, 1200 rpm), las células se resuspendieron en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Canto II (BD Biosciences).

La **Figura 44A** muestra que la mezcla de Fc-RGY-A647 con el anticuerpo IgG1-2F8-RGY específico de EGFR dio como resultado una señal fluorescente dependiente de la dosis en células A431 positivas para EGFR. Por el contrario, IgG1-7D8-RGY específico para CD20 no pudo reclutar Fc-RGY-A647 a las células A431 negativas para CD20. Ninguna de las otras combinaciones de control probadas de Fc-RGY-A647 mezcladas con IgG1-2F8 o IgG1-2F8-E345R dio como resultado una señal fluorescente. Además, ninguna de las combinaciones de control de IgG1-RTX-A647 específico de CD20 mezclado con IgG1-2F8 ni IgG1-2F8-RGY indujo una señal fluorescente en las células A431.

Estos datos indican que el fragmento Fc-RGY marcado se reclutó específicamente a las células A431 mediante la incorporación en complejos oligoméricos con anticuerpos IgG1-2F8-RGY que se unen a EGFR en células A431.

De manera similar, la **Figura 44B** muestra que los anticuerpos específicos para CD20 IgG1-7D8-RGY e IgG1-RTX-RGY fueron capaces de reclutar fragmentos Fc-RGY-A647 a células Daudi positivas para CD20. Por el contrario, el IgG1-2F8-RGY específico de EGFR no pudo reclutar Fc-RGY-A647 a las células Daudi negativas para EGFR. Las muestras de control negativo de Fc-RGY-A647 solo, o Fc-RGY-A647 mezclado con IgG1-7D8 o IgG1-RTX, no produjeron una señal fluorescente en las células Daudi.

En resumen, estos datos muestran que las moléculas Fc-RGY pueden formar complejos en solución y pueden ser reclutados a las células por los anticuerpos que contienen RGY que se unen específicamente a las células.

Ejemplo 31

La oligomerización reversible de moléculas de anticuerpos con mutaciones que mejoran la interacción Fc-Fc se puede controlar mediante el pH.

El ejemplo 23 mostró que el anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, abreviado en la presente memoria como

IgG1-005-RGY, era capaz de hexamerizar a pH 6,8, mientras que al reducir el pH a 5,0 se disolvía el complejo hexamérico en subunidades monoméricas individuales. Para caracterizar esta propiedad en detalle, se mezclaron ácido cítrico 50 mM y Na₂HPO₄ 100 mM en diferentes proporciones para generar tampones de fase móvil a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0. Las muestras de IgG1-005-RGY se intercambiaron en estos tampones y se separaron por HP-SEC utilizando la fase móvil correspondiente. La **Figura 45A** muestra que bajar el pH se producía un desensamblaje de los complejos multiméricos en subunidades monoméricas; que se necesitaba un pH de aproximadamente 5,0 para eliminar los multímeros de la mezcla; y que a pH 6,0, aproximadamente la mitad de los complejos se habían desensamblado.

La capacidad para controlar el estado oligomérico del anticuerpo reduciendo y aumentando el pH de manera reversible podría ser útil para aplicaciones en el procesamiento aguas arriba o aguas abajo durante la elaboración. Para probar si el desensamblaje mediado por el pH era reversible, una muestra con hexámeros de anticuerpos se llevó a pH 5,0 y se dividió en dos muestras, una de las cuales volvió a pH 7,0. La **Figura 45B** expone que la muestra que se expuso a pH 5,0 y posteriormente se volvió a llevar a pH 7,0 (pH 7,0 rev), formó complejos de anticuerpos con una eficacia muy similar a la muestra de referencia mantenida a pH 7,0.

Ejemplo 32

La purificación de la proteína IgG1-RGY y la eficacia del procesamiento aguas abajo se pueden controlar mediante la elección de la condición de pH del tampón

La purificación de la proteína A es la piedra angular del procesamiento aguas abajo de anticuerpos y se implementa en una gran cantidad de procesos de fabricación de anticuerpos. Debido a que el sitio de unión a la proteína A se solapa parcialmente con la interfase de la interacción Fc:Fc que media la hexamerización de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, en la presente memoria abreviado como IgG1-005-RGY, se intentó cargar columnas de proteína A a pH 7,4, lo que permitía hexamerización y a pH 5,0, que bloqueaba la hexamerización como se demuestra en el Ejemplo 23.

En el ejemplo 20, se describió la clonación del anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, abreviado en la presente como IgG1-005-RGY. IgG1-005-RGY se expresó en células EXPI293F esencialmente como describe el fabricante (Invitrogen), después de lo cual el sobrenadante se recogió por centrifugación a 300 g durante 10 min. El sobrenadante se concentró 4 veces utilizando un dispositivo de filtración de flujo tangencial de fibra hueca MiniKros M15S-260-01P con una membrana de corte de 50 kDa (SpectrumLabs, Rancho Dominguez CA, EE.UU.), produciendo el sobrenadante con una concentración de proteína de 1,1 g/L. El sobrenadante se dividió en dos partes, una de las cuales se mantuvo al pH original de 7,5, mientras que el otro lote se ajustó a pH 5,0 mediante adición gota a gota de ácido cítrico-NaOH 1,0 M de pH 3,0. Ambos lotes se filtraron sobre un filtro frontal de 0,20 µM.

El lote de sobrenadante mantenido a pH 7,5 se cargó a una velocidad de flujo baja de 109 cm/h para imitar las condiciones de procesamiento aguas abajo a escala de fabricación, en una columna de proteína A de 1,0 mL (HiTrap MabSelectSuRe, GE Healthcare, Uppsala, Suecia), que se lavó consecutivamente con PBS (fosfato de sodio 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4; B. Braun, Oss, Países Bajos), después de lo cual se eluyó la proteína IgG unida utilizando ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3,0. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9,0 y se sometió a diálisis durante la noche a PBS. Después de la diálisis, la muestra se filtró en condiciones estériles sobre un filtro frontal de 0,20 µM.

El lote llevado a pH 5,0 se cargó a un caudal de 109 cm/h en la misma columna de proteína A de 1,0 mL (HiTrap MabSelectSuRe), que se lavó consecutivamente con ácido cítrico/citrato 20 mM pH 5,0, después de lo cual se unió la proteína IgG unida. se eluyó utilizando ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3,0. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9,0 y se sometió a diálisis durante la noche frente PBS. Después de la diálisis, la muestra se filtró en condiciones estériles sobre un filtro frontal de 0,20 µM.

Los flujos de ambas purificaciones de proteínas se recogieron y purificaron utilizando una columna MabSelect SuRe de 5,0 mL que produjo aproximadamente 50 mg de proteína, lo que demuestra que la columna MabSelectSuRe de 1,0 mL se había saturado de manera eficaz.

Los rendimientos de IgG1-005-RGY se determinaron midiendo A280 de las muestras de elución sometidas a diálisis utilizando un dispositivo Nanodrop (ThermoScientific, Wilmington DE, EE.UU.). La purificación de proteína A a una escala de 1,0 mL a pH 7,0 produjo 21,45 mg de IgG1-005-RGY, mientras que la purificación a pH 5,0 produjo 29,14 mg de IgG1-005-RGY. En conclusión, el rendimiento de la proteína aumentó aproximadamente 36% al realizar la unión del anticuerpo a la proteína A en condiciones que mantienen IgG1-005-RGY monomérico.

Ejemplo 33

Muerte celular programada (PDC) por IgG2-005 hexamérico estable

Para probar si diferentes variantes isotípicas de anticuerpos IgG que contienen la mutación triple E345R/E430G/S440Y podrían inducir la muerte celular programada (PCD), se generó el anticuerpo IgG2-005-E345R/E430G/S440Y (IgG2-005-RGY) mediante métodos conocidos en la técnica. Se cultivaron $1,0 \times 10^5$ células Ramos que expresaban CD38 durante 24 horas en placas de fondo en U de 96 pocillos (Nalgene Nunc) en presencia de una serie de diluciones (10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,005 y 0,0025 $\mu\text{g/mL}$) de IgG2-005 de tipo salvaje, IgG2-005-RGY, IgM-005 hexamérico o anticuerpos de control humanos IgG1-2F8 e IgG1-2F8-RGY, que reconocían EGFR, que no se expresa en las células Ramos. La PCD se cuantificó después de estas 24 horas mediante tinción con anexina V-FITC (ensayo de unión a anexina; BD Biosciences, San Diego, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de células positivas para anexina V-FITC se determinó utilizando un FACS (BD).

La **Figura 46** muestra que IgG2-005-RGY demostró una mayor capacidad de muerte celular programada en comparación con IgG2-005 de tipo salvaje y los anticuerpos de control IgG1-2F8 e IgG1-2F8-RGY. La IgM hexamérica no indujo PCD en las condiciones probadas.

Ejemplo 34

IgG-005-RGY frente a CD38 supera a la IgM-005 hexamérica en un ensayo de CDC en células B

Para comparar la eficacia de la CDC de IgG1-005-RGY con la de IgM, el dominio VH de IgG1-005 se clonó en una cadena principal de IgM por métodos conocidos en la técnica, y se expresó en ausencia de la cadena J para producir hexámeros de IgM contra CD38. La construcción de IgG1-005-E345R/E430G/S440Y (aquí denominada IgG1-005-RGY) se describió en el Ejemplo 20.

El análisis mediante HP-SEC de los diferentes anticuerpos se realizó como se describe en el Ejemplo 20, pero utilizando PBS (fosfato sódico 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4; B. Braun, Oss, Países Bajos) como fase móvil. La **Figura 47** muestra que la IgM-005 expresada en ausencia de la cadena J produjo una molécula con una movilidad ligeramente mayor en HP-SEC que la IgG1-005-RGY, como se podría esperar debido al mayor peso molecular de la IgM hexamérica en comparación con IgG1-005-RGY hexamérico.

La eficacia de la CDC de IgG1-005-RGY se comparó con la de IgG1-005 de tipo salvaje e IgM-005 hexamérico probando series de concentración de anticuerpos (0,0003-10 $\mu\text{g/mL}$ en diluciones 1:2) en un ensayo CDC in vitro como se describe en el Ejemplo 18. La **Figura 48** muestra que IgG1-005-RGY mostró una actividad CDC más potente en las células Daudi y Wien133 que IgM-005 hexamérica. La IgG1-005 de tipo salvaje mostró una eficacia de CDC menor que la de IgG1-005-RGY e IgM-005 en las células Daudi, y ninguna actividad de destrucción sobre las células Wien133. IgG1-b12 se utilizó como un anticuerpo de control negativo sin unión celular. Las concentraciones de IgG1-005 monomérico (es decir, proteína dimérica única), IgG1-005-RGY hexamérico e IgM-005 hexamérico se indican como equivalentes de unión a C1q para permitir la comparación de complejos de IgG no covalente e IgM covalente con diferente peso molecular.

En resumen, IgG1-005-RGY podría inducir la lisis mediada por el complemento de células diana de manera más eficaz que IgM-005 a concentraciones de anticuerpos que se unen a cantidades equivalentes de C1q.

Ejemplo 35

La introducción de las mutaciones triples E345R/E430G/S440Y en el anticuerpo anti-EGFR IgG1-2F8 aumenta la eficacia de la lisis mediada por CDC de líneas celulares tumorales sólidas positivas para EGFR.

Para probar si la introducción de las mutaciones triples E345R/E430G/S440Y en un anticuerpo diana tumoral sólido podría conducir a la activación de la lisis mediada por el complemento, se generó IgG1-2F8-E345R/E430G/S440Y (aquí denominado IgG1-2F8-RGY) por métodos conocidos en la técnica.

La eficacia de la CDC por IgG1-2F8-RGY se probó en líneas celulares tumorales A431 y Difi positivas para EGFR y se comparó con IgG1-2F8 de tipo salvaje y los anticuerpos de control IgG1-005 e IgG1-005-RGY. Los anticuerpos de control reconocen CD38, que no se expresa en las células A431 ni Difi.

Después de que las células tumorales sólidas se separaron utilizando tripsina-EDTA en solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se lavaron y se pasaron a través de un filtro de células de nylon de 40 μm (DB Falcon™) y se resuspendieron en PBS a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Las células se tiñeron durante 30 minutos a 37°C utilizando SYBR Green (SYBR Green 57563 en DMSO, Invitrogen, diluido 25000x). Después de la centrifugación (1200 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente), las células se resuspendieron en RPMI1640/BSA al 0,1% a una concentración de $3,0 \times 10^5$ células/mL. Se prepararon diluciones seriadas de anticuerpos (0,0003-10 $\mu\text{g/mL}$) en RPMI/BSA al 0,1% con un suplemento de TOPRO-3 (yoduro de TOPRO-3 T3605, diluido 1600x). Las células se sembraron a 30.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (placas

de color negro de 96 pocillos ABI™ 4315480 FMAT); después de la adición de las diluciones seriadas del anticuerpo, las placas se incubaron durante 15' en un agitador (300 rpm, RT). Se añadió suero humano normal (NHS, Sanquin) a una concentración final de 20%. Las placas se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Las cantidades de células muertas (positivas para TOPRO-3) y las células totales (positivas para SYBR Green) se determinaron utilizando un citómetro de imágenes Celigo® (Brooks Life Science Systems). Los resultados se analizaron con GraphPad Prism 5.04.

La **Figura 49** muestra que la eficacia para inducir la lisis mediada por el complemento de células tumorales sólidas positivas para EGFR fue considerablemente mayor para IgG1-2F8-RGY que IgG1-2F8 de tipo salvaje.

Ejemplo 36

IgG1-005-RGY muestra la activación del complemento independiente de la diana en contraste con IgG1-005 de tipo salvaje.

En el ejemplo 20, se describió la clonación del anticuerpo IgG1-005-E345R/E430G/S440Y, en la presente memoria abreviado como IgG1-005-RGY. Para probar si IgG1-005-RGY podría activar el complemento en solución en ausencia de células diana, se analizó la formación de C4d, un marcador para la activación de la vía clásica del complemento. La activación del complemento se determinó midiendo las concentraciones de C4d después de incubarse 100 µg/mL de anticuerpo en suero humano normal al 90% durante 1 hora a 37°C en microplacas de polipropileno de 96 pocillos de baja unión a proteínas (en forma de U y estériles; Greiner 650261). Las concentraciones de C4d se midieron en un ELISA (kit MicroVue C4d EIA, Quidel Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó una muestra de IgG agregada por calor (HAG) como control positivo para la activación del complemento en solución. La **Figura 50** muestra que HAG indujo una producción eficaz de C4d, mientras que IgG-005 de tipo salvaje no mostró activación del complemento en estas condiciones. En contraste, IgG1-005-RGY indujo niveles elevados de C4d, indicativos de activación del complemento en solución.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genmab B.V.

5 <120> PROTEÍNA DIMÉRICA CON MUTACIONES TRIPLES

<130> P/0076-WO

<160> 15

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 330

15 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

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

ES 2 758 979 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2

<211> 326

5

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

ES 2 758 979 T3

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

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

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3
<211> 377
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 3

5

ES 2 758 979 T3

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

ES 2 758 979 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4

<211> 327

5 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 4

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ES 2 758 979 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

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

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

ES 2 758 979 T3

<210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS

5

<400> 5
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

ES 2 758 979 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 6

<211> 201

5 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 6

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 35 40 45

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 65 70 75 80

ES 2 758 979 T3

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
85 90 95

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
130 135 140

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
195 200

<210> 7
<211> 201
5 <212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 7
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
35 40 45

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
65 70 75 80

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
85 90 95

ES 2 758 979 T3

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 100 105 110

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 130 135 140

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 195 200

<210> 8
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS

5

<400> 8
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 35 40 45

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 85 90 95

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 100 105 110

ES 2 758 979 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 130 135 140

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 195 200

<210> 9
 <211> 201
 5 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS

<400> 9
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 35 40 45

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 65 70 75 80

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 85 90 95

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 100 105 110

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 115 120 125

ES 2 758 979 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 130 135 140

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 195 200

<210> 10

<211> 201

5 <212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 10

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 35 40 45

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 85 90 95

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 100 105 110

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 130 135 140

ES 2 758 979 T3

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

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
195 200

<210> 11

<211> 204

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

5

<400> 11

Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu
1 5 10 15

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

Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys
35 40 45

Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr
50 55 60

Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro
65 70 75 80

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
85 90 95

Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
100 105 110

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro
115 120 125

Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp
130 135 140

Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
145 150 155 160

10

ES 2 758 979 T3

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys
 165 170 175

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln
 180 185 190

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 195 200

<210> 12

<211> 221

<212> PRT

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 12

Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr
 1 5 10 15

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

Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys
 35 40 45

Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp
 50 55 60

Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro
 85 90 95

Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu
 100 105 110

Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val
 115 120 125

Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr
 130 135 140

Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe
 145 150 155 160

Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly
 165 170 175

10

ES 2 758 979 T3

Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe
 180 185 190

Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn
 195 200 205

Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
 210 215 220

<210> 13

<211> 221

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

5

<400> 13

Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro
 20 25 30

Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys
 35 40 45

Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp
 50 55 60

Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro
 85 90 95

Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu
 100 105 110

Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val
 115 120 125

Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr
 130 135 140

Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe
 145 150 155 160

Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly
 165 170 175

10

ES 2 758 979 T3

Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe
 180 185 190

Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn
 195 200 205

Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
 210 215 220

<210> 14

<211> 223

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

5

<400> 14

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
 20 25 30

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His
 35 40 45

Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp
 50 55 60

Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp
 65 70 75 80

Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala
 85 90 95

Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu
 100 105 110

Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser
 115 120 125

Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser
 130 135 140

Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp
 165 170 175

10

ES 2 758 979 T3

Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn
180 185 190

Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu
195 200 205

Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
210 215 220

<210> 15

<211> 209

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 15

Ala Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe
1 5 10 15

Val Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala
20 25 30

Gly Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His
35 40 45

Ser Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser
50 55 60

Leu Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser
65 70 75 80

Leu Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala
85 90 95

Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu
100 105 110

Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn
115 120 125

Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly
130 135 140

Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp
145 150 155 160

Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala
165 170 175

5

10

ES 2 758 979 T3

Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn
180 185 190

Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met
195 200 205

Lys

REIVINDICACIONES

1. Una proteína dimérica que comprende un primer y un segundo polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido al menos las regiones C_H2 y C_H3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en donde al menos uno de los polipéptidos comprende una región de unión que se une específicamente a una diana, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son R, G e Y, respectivamente; o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, que está predominantemente en forma oligomérica, en un tampón de fosfato a un pH de aproximadamente 6,8, que está predominantemente en forma monomérica a un pH de menos de 6,0, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración de EU establecida en Kabat.
2. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos uno de los polipéptidos comprende una región de unión que se une específicamente a una diana, la diana es una molécula presente sobre una célula, bacteria o virión.
3. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo.
4. La proteína dimérica de la reivindicación 3, en donde cada uno de los primer y segundo polipéptidos comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina asociada con una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende regiones variables y constantes de cadena ligera para formar una primera y una segunda región de unión a antígeno, que opcionalmente se unen al mismo antígeno.
5. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos el aminoácido en la posición correspondiente a K439 no es K, p. ej., E o D.
6. La proteína dimérica según la reivindicación 5, en donde en ambos polipéptidos, p. ej., cada polipéptido, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, K439 y S440 son R, G, E e Y.
7. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a K447 es D o E y/o el aminoácido en la posición correspondiente a Q386 es K.
8. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a K447 es K, R o H y el polipéptido o los polipéptidos comprenden
- a) un residuo de aminoácido en la posición 448 que es P; o
 - b) un residuo de aminoácido en la posición 448 que es K, R o H y un residuo de aminoácido en la posición 449 que es P.
9. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un fármaco, toxina, radiomarca, agente radioopaco, agente paramagnético, agente fluorescente, agente fosforescente, agente potenciador de ultrasonidos o polietilenglicol (PEG), opcionalmente conjugado con al menos uno de los polipéptidos a través de un conector.
10. La proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un homodímero o un heterodímero.
11. La proteína dimérica de la reivindicación 10, en donde dichos primer y segundo polipéptidos son del mismo isotipo, cada uno comprende las regiones CH2, CH3 y bisagra de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, y en donde
- el aminoácido en una posición seleccionada entre K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 no es K, T, L, K, D, F e Y, respectivamente, en el primer polipéptido, p. ej., K409 es R y
 - el aminoácido en una posición seleccionada entre F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 no es F, T, L, K, D, Y y K, respectivamente, en el segundo polipéptido, p. ej., F405 es L.
12. Un hexámero que comprende seis proteínas diméricas asociadas no covalentemente, cada una de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un hexámero que comprende seis moléculas asociadas no covalentemente, al menos una de las cuales es una proteína dimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y al menos una de las cuales es un anticuerpo que comprende un dominio Fc que comprende al menos las regiones CH2, CH3 y bisagra, en donde el anticuerpo

es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

14. Una composición que comprende la proteína dimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y/o el hexámero de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición que comprende una primera proteína dimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una segunda proteína dimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición que comprende un primer y segundo polipéptidos de una primera proteína dimérica, en donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, K439 y S440 en la cadena pesada de IgG1 humana son R, G, E e Y, respectivamente, y un primer y segundo polipéptidos de una segunda proteína dimérica, en donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430, Y436 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana son R, G, I y K, respectivamente, que está predominantemente en forma oligomérica, en un tampón de fosfato a un pH de aproximadamente 6,8, que está predominantemente en forma monomérica a un pH inferior a 6,0.

17. La composición de la reivindicación 15, en donde tanto la primera como la segunda proteínas diméricas comprenden el primer y segundo polipéptidos, en donde en dichos primer y segundo polipéptidos de dichas primera y segunda proteínas diméricas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en la cadena pesada de IgG1 humana son R, G e Y, respectivamente; o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente.

18. La composición de la reivindicación 15, en donde en ambos de dichos primer y segundo polipéptidos de dichas primera y segunda proteínas diméricas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana, son R, G e Y, respectivamente.

19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde en dichos primer y/o segundo polipéptidos de la primera proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 es D o E, y en dichos primer y/o segundo polipéptidos de la segunda proteína dimérica, el aminoácido en la posición correspondiente a K447 es K, R o H; un aminoácido en la posición correspondiente a 448 es P, K, R o H; y/o un aminoácido en la posición correspondiente a 449 es P.

20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde al menos una de la primera y segunda proteínas diméricas es un anticuerpo.

21. La composición de la reivindicación 20, en donde el primer y segundo anticuerpos se unen a diferentes antígenos o a diferentes epítomos sobre el mismo antígeno.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en donde el portador farmacéuticamente aceptable es una solución tamponada acuosa, p. ej., en donde el pH de la solución tamponada acuosa es al menos aproximadamente 6,5, tal como de 6,5 a aproximadamente 9,0, tal como de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, tal como aproximadamente 7,4.

23. La composición de la reivindicación 21, que comprende un sistema tampón de fosfato, p. ej., en donde el pH de la solución tamponada acuosa es inferior a pH 6,5, tal como de aproximadamente 4,0 a 6,4, tal como de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

24. La composición de la reivindicación 23, que comprende un sistema tampón de acetato, histidina, glicina, citrato, nicotinato, lactato y/o succinato.

25. Un método para aumentar la oligomerización en solución de una proteína dimérica que comprende un primer y segundo polipéptidos, comprendiendo cada uno al menos las regiones CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, comprendiendo el método la introducción en dichos primer y segundo polipéptidos, sustituciones de aminoácidos en al menos las posiciones correspondientes a E345, E430 y S440 en una cadena pesada de IgG1 humana que son R, G e Y, respectivamente; o alternativamente K, G e Y, respectivamente; o alternativamente R, S e Y, respectivamente; o alternativamente R, G y W, respectivamente, en donde los aminoácidos están numerados de acuerdo con la numeración Eu como se expone en Kabat.

26. El método de la reivindicación 25, en donde la proteína dimérica es un anticuerpo.

27. Un kit de partes que comprende una primera proteína dimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y una segunda proteína dimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso simultáneo,

separado o secuencial en la generación de imágenes, diagnóstico o terapia.

5 28. La proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y 27, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, tal como una infección bacteriana, viral o parasitaria, enfermedad autoinmunitaria, cáncer, inflamación y/o reducción del riesgo de choque séptico causado por una infección bacteriana.

10 29. La proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, 27 y 28, en donde la proteína dimérica comprende una región de unión que se une específicamente a un lipopolisacárido (LPS), un lipooligosacárido (LOS), un endotoxina delta, toxina botulínica, exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae*, un superantígeno bacteriano, una enterotoxina termoestable, citolisina, una toxina formadora de canales, una toxina enzimáticamente activa o una micotoxina.

15 30. La proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, 28 y 29, para su uso en la generación de imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero.

20 31. La proteína dimérica, el hexámero, la composición o el kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, 28, 29 y 30 para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana, viral o parasitaria, para la generación de imágenes de al menos una parte del organismo de un ser humano u otro mamífero, o para modular el aclaramiento de una molécula diana del organismo de un ser humano u otro mamífero.

25 32. La proteína dimérica, el hexámero, la composición, el kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y 28 para su uso en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, rechazos de trasplantes de órganos y agotamiento de C1q en el sistema humoral en un ser humano.

Figura 1

Moléculas de IgG en formación de hexámero

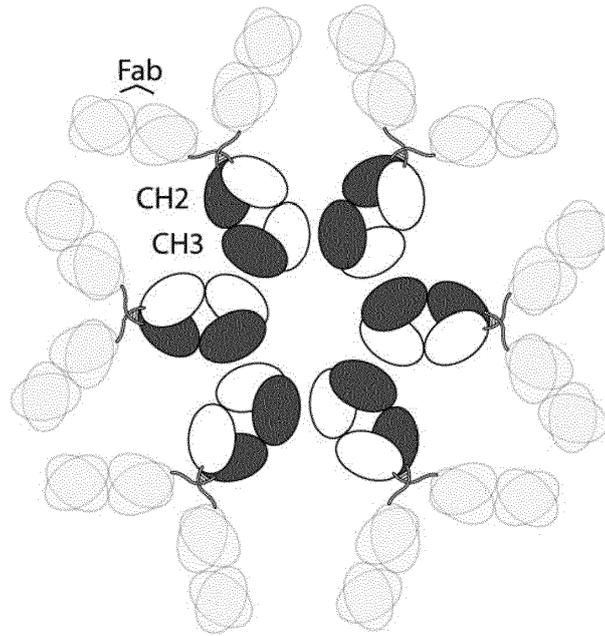


Figura 2

IgG1 247 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL 306
 IgG1f PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 IgG2 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
 IgG3 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVL
 IgG4 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
 IgE SPFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTL
 IgA1 ALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASG-VTFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSSVL
 IgA2 ALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASG-ATFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSSVL
 IgM SFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS-VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEA
 IgD AVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAG-KVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRL

 IgG1 307 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSREDELTK-NQVS 364
 IgG1f TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
 IgG2 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS-KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
 IgG3 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
 IgG4 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK-NQVS
 IgE PVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTT-KTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSR-DKRT
 IgA1 PGCAEPWNHGKFTTCTAAYPEKTPLTATLS--KSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVT
 IgA2 PGCAQPWNHGKFTTCTAAHPELKTPLTANIT--KSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVT
 IgM SICEDDWSNGERFTCTVTHTDLPSPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESAT
 IgD TLRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAA---SW

 IgG1 365 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ 419
 IgG1f LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 IgG2 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPMLDS---DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 IgG3 LTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQ--PENNYNTTPMLDS---DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 IgG4 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 IgE LACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTK---GSGFFVFSRLEVTRAWEQ
 IgA1 LTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKK
 IgA2 LTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKK
 IgM ITCLVTGFSPADVVFQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEP-QAPGRYFAHSILTVSEEEWNT
 IgD LICEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQP--GSTTFWAWSVLRVPAPPSPQ

 IgG1 420 GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK----- 447
 IgG1f GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----
 IgG2 GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----
 IgG3 GNIFSCSVMHEALHN-RFTQKSLSLSPGK-----
 IgG4 GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSLGK-----
 IgE KDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGK-----
 IgA1 GDTFSCMVGHEALPL-AFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
 IgA2 GDTFSCMVGHEALPL-AFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
 IgM GETYTCVA-HEALPN-RVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
 IgD PATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSVVDHGPVK-----

Figura 2 (continuación)

IgG1 = aa 130-330 of Uniprot entry P01857
IgG1f= IgG1 allotypic variant "f"
IgG2 = aa 126-326 of Uniprot entry P01859
IgG3 = aa 177-377 of Uniprot entry P01860
IgG4 = aa 127-327 of Uniprot entry P01861
IgE = aa 225-428 of Uniprot entry P01854
IgA1 = aa 133-353 of Uniprot entry P01876
IgA2 = aa 120-340 of Uniprot entry P01877
IgM = aa 230-452 of Uniprot entry P01871
IgD = aa 176-384 of Uniprot entry P01880

Figura 4

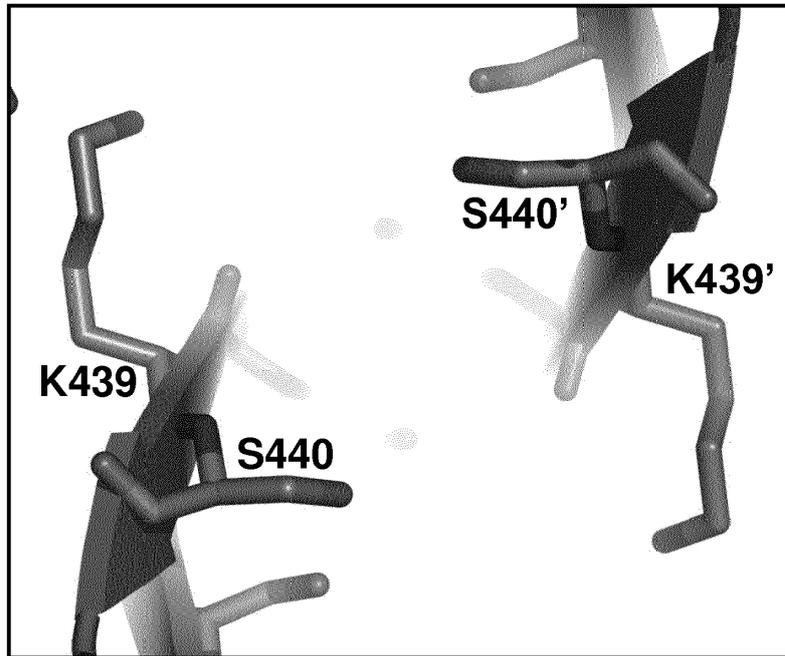


Figura 5A

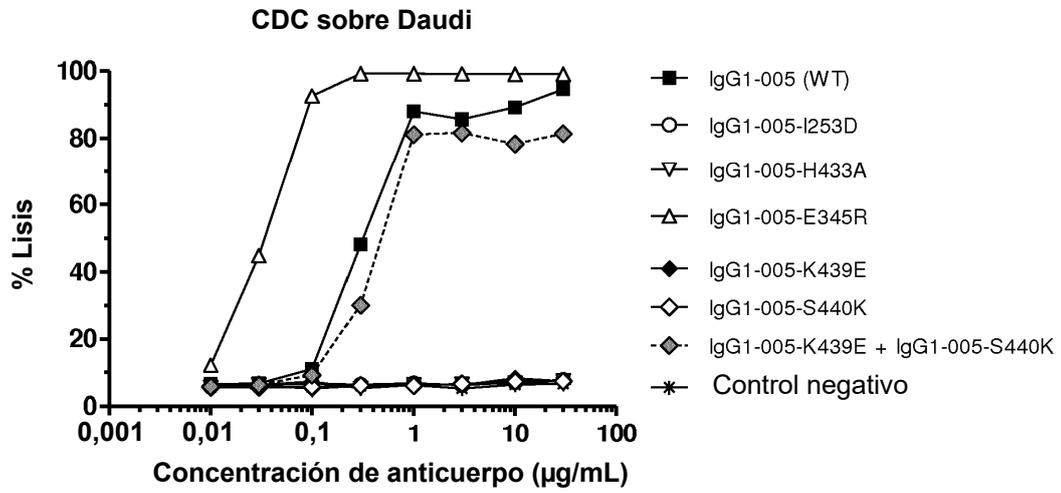


Figura 5B

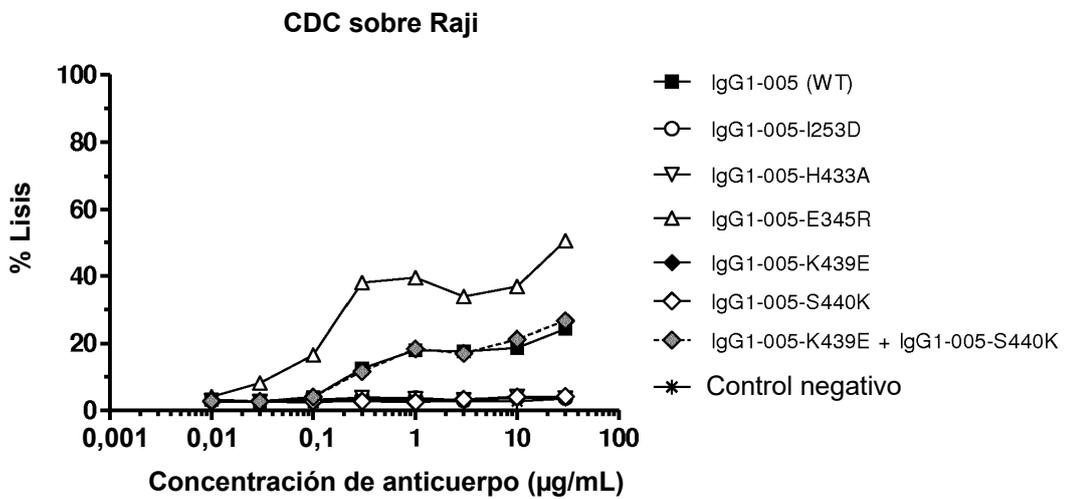


Figura 5C

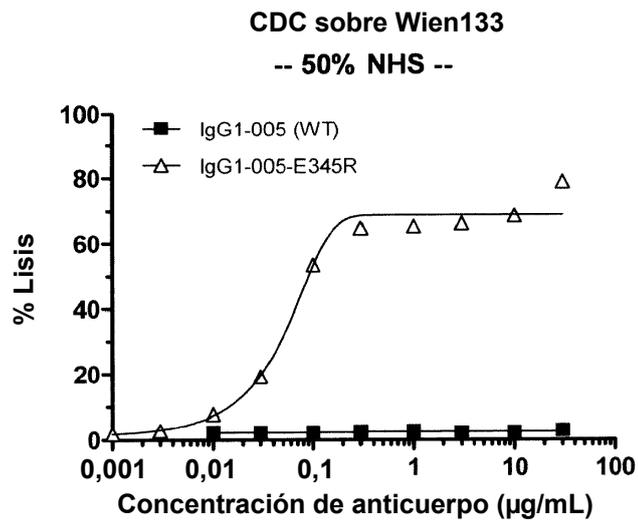
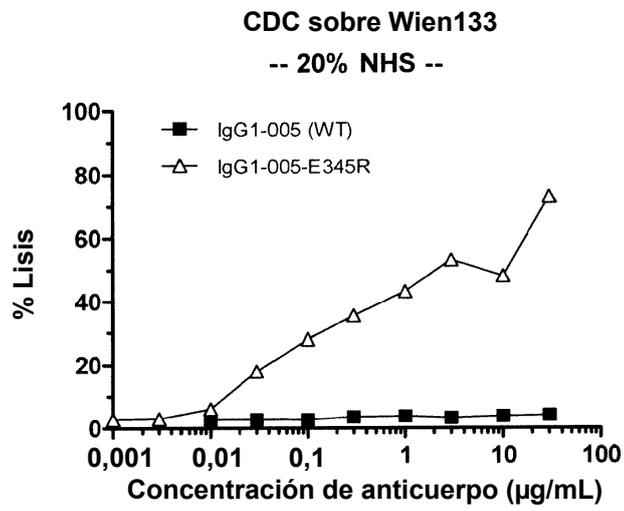


Figura 5D

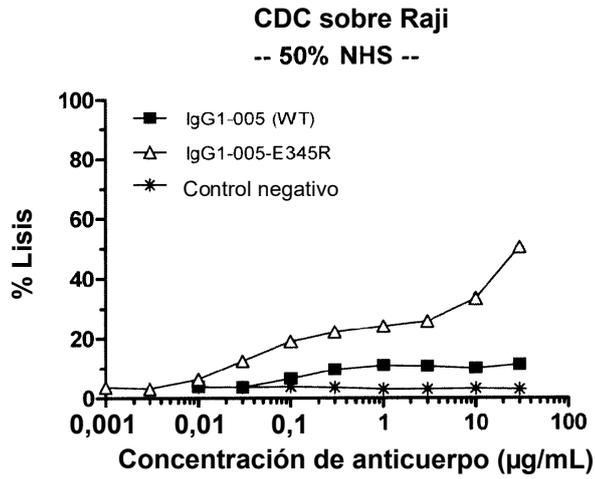
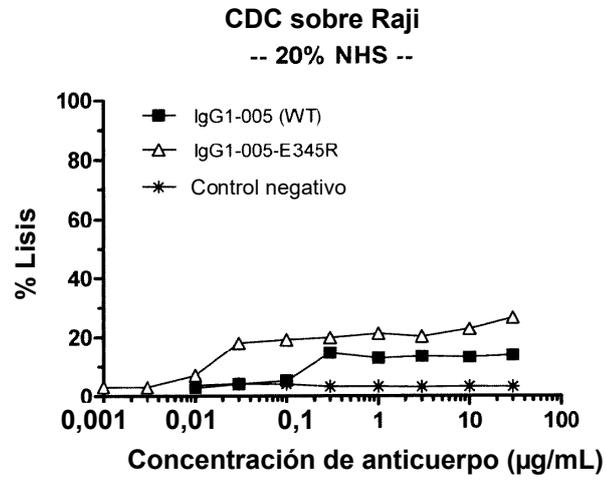


Figura 5D cont

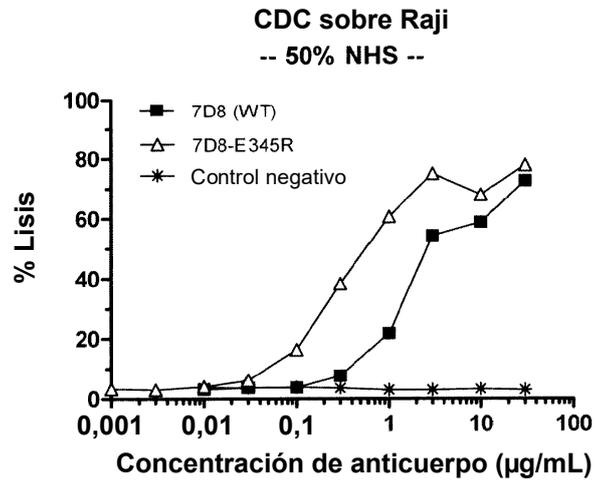
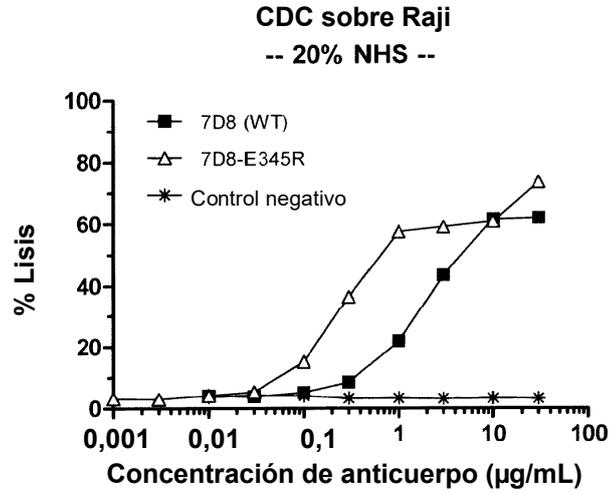


Figura 6

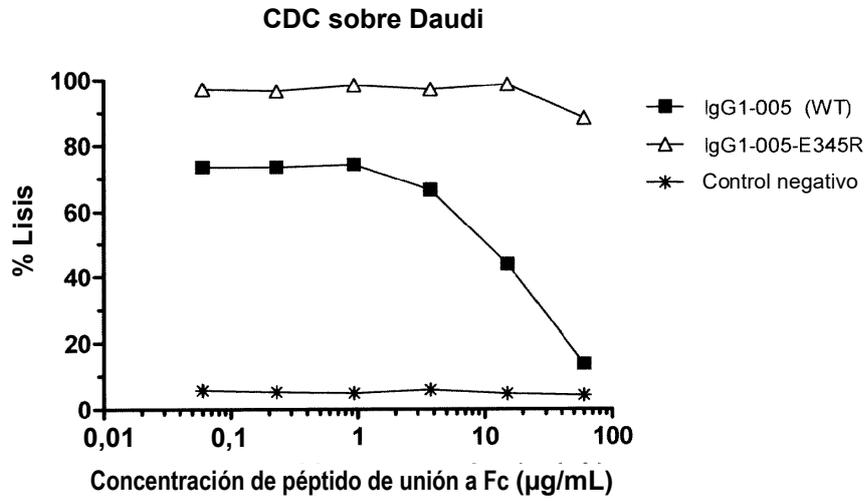


Figura 7A

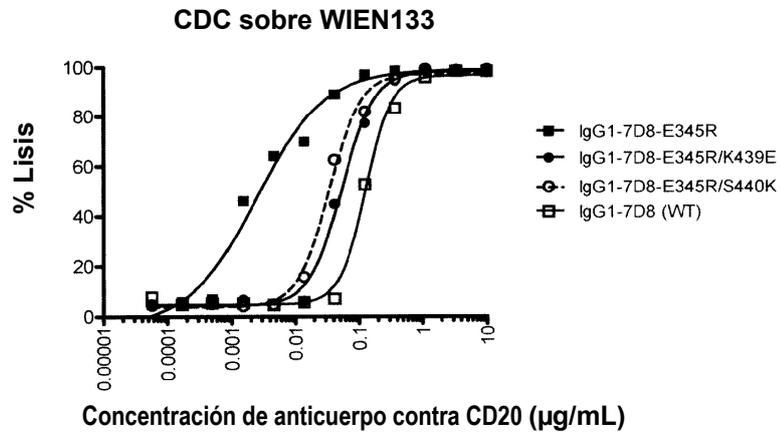


Figura 7B

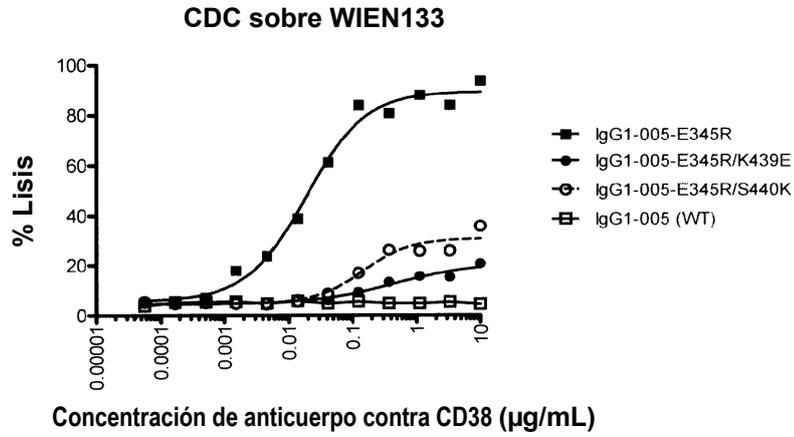


Figura 7C

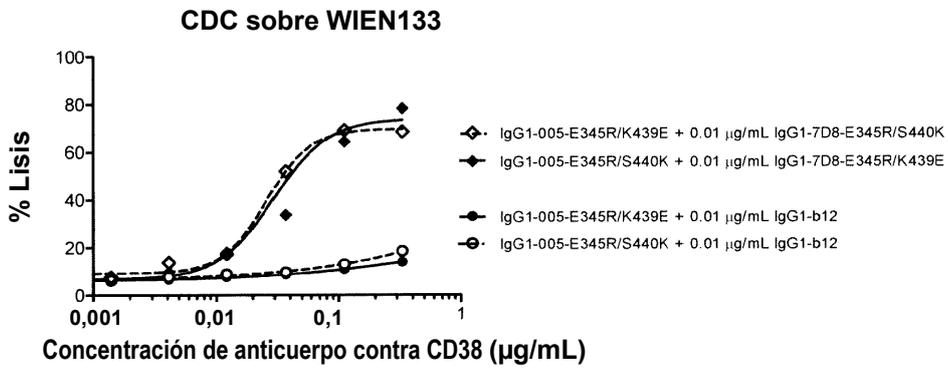


Figura 7D

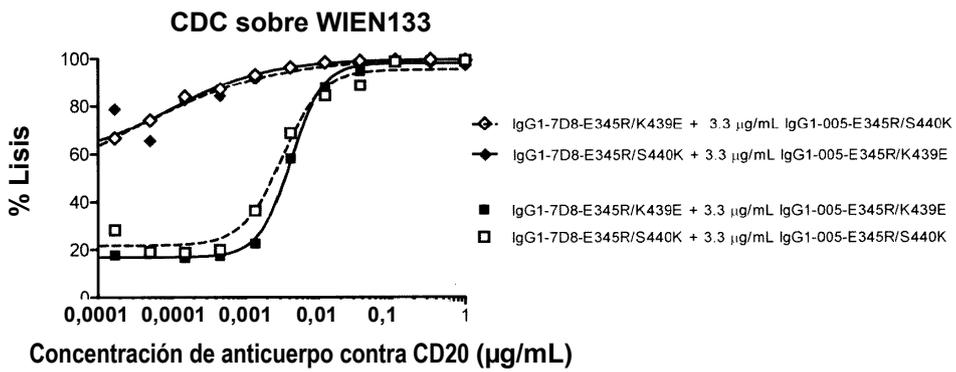


Figura 8A

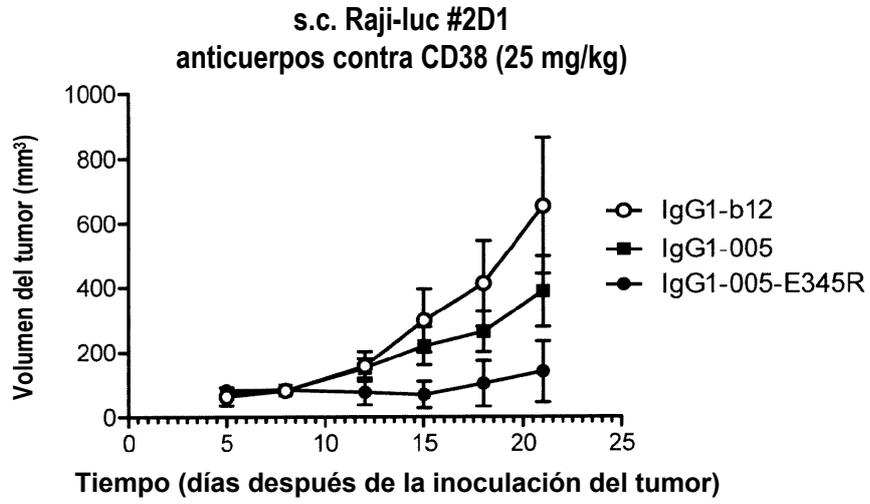


Figura 8B

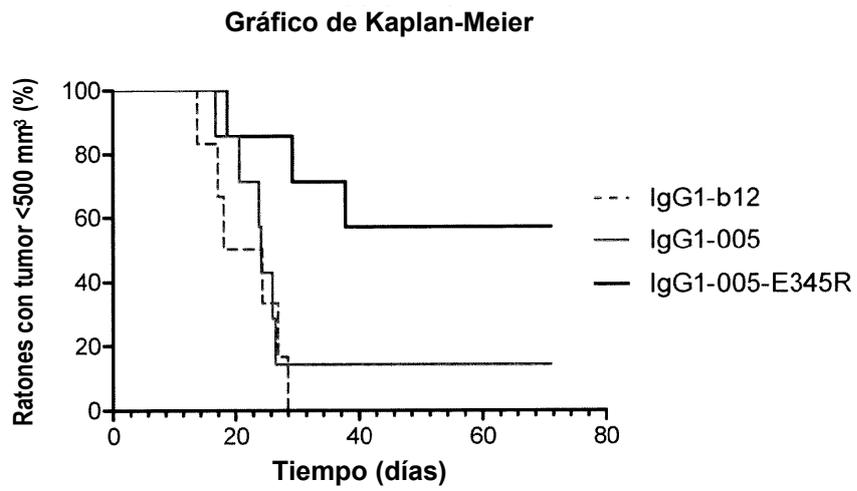


Figura 9

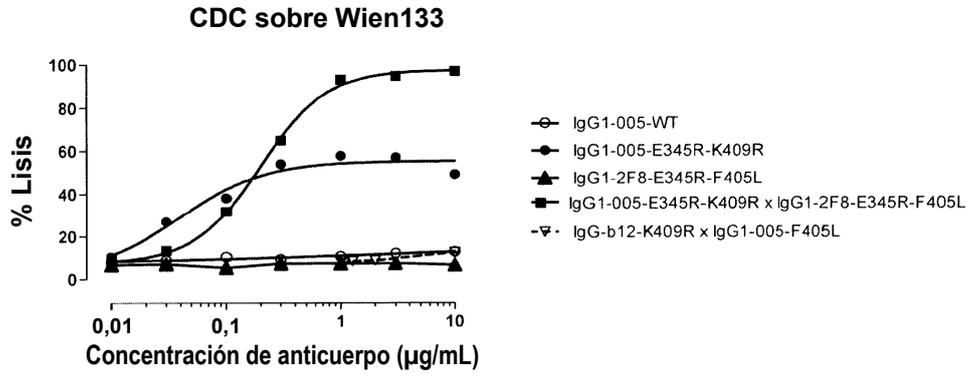


Figura 10A

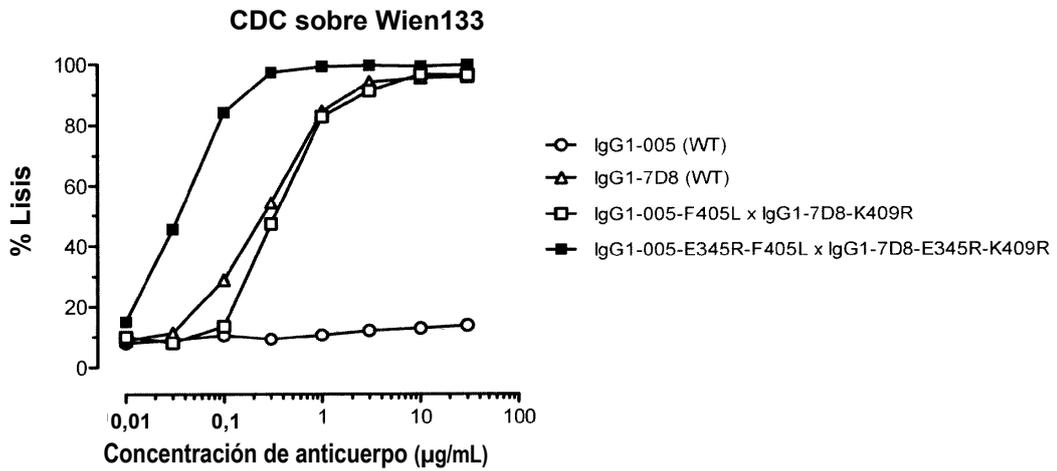


Figura 10B

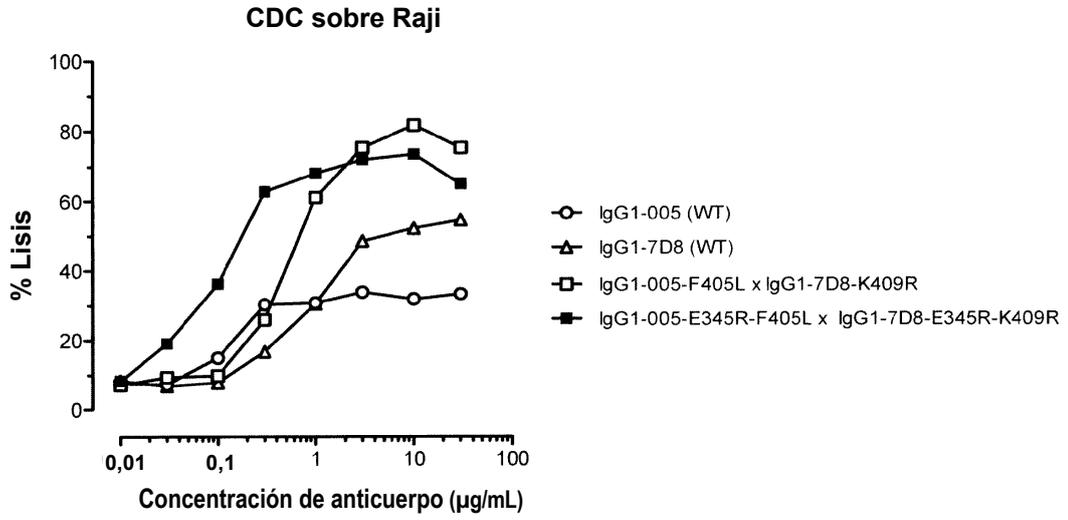


Figura 11

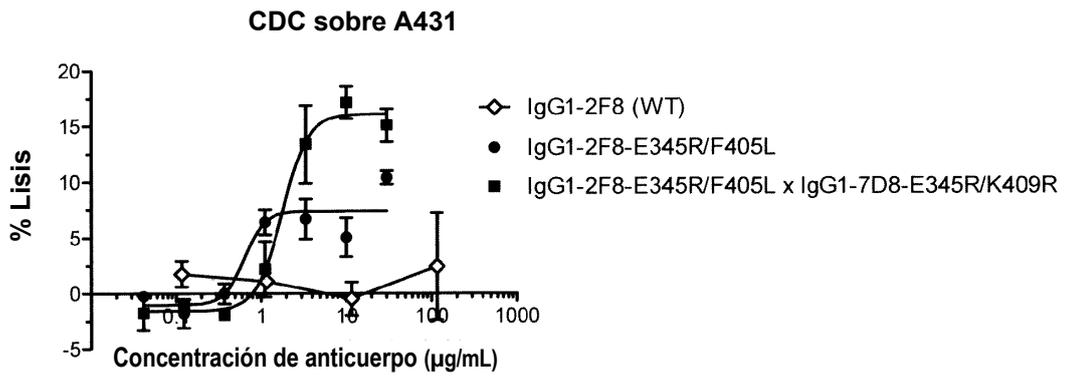


Figura 12A

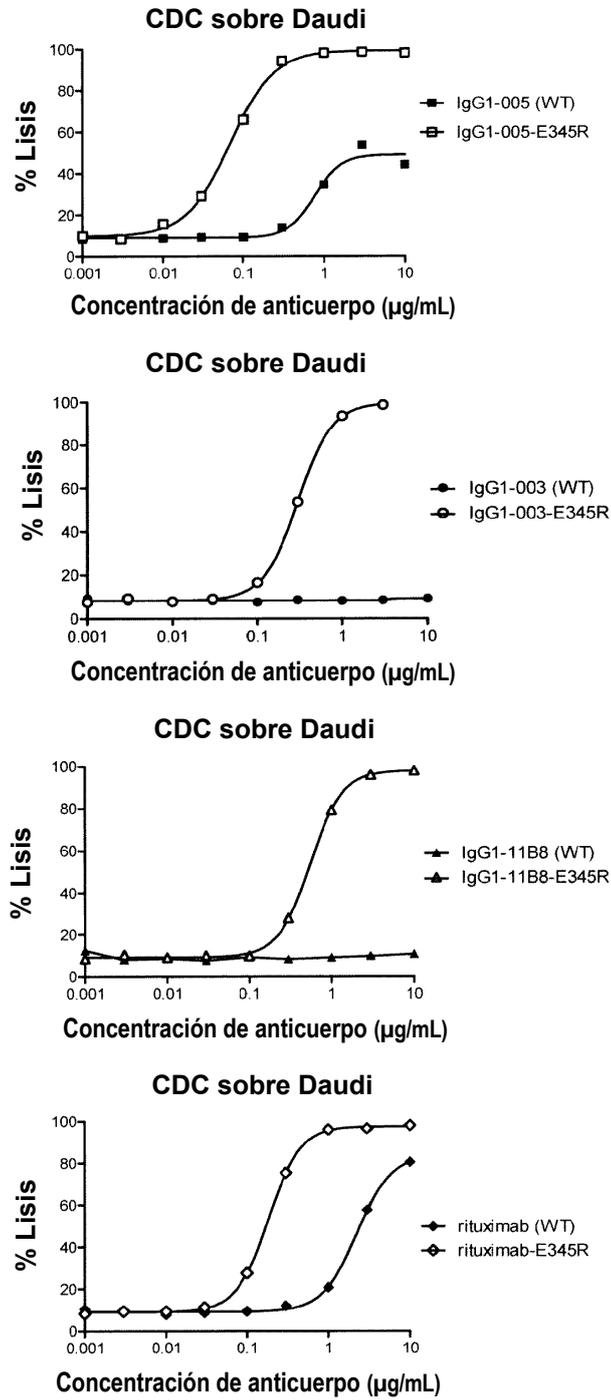


Figura 12B

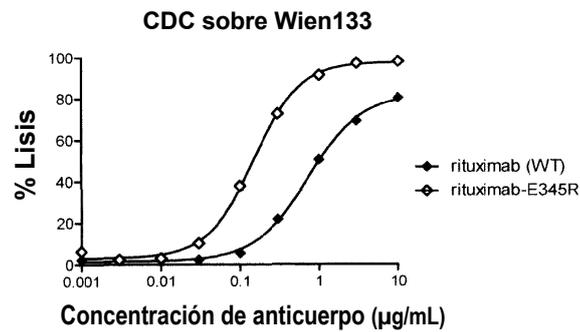
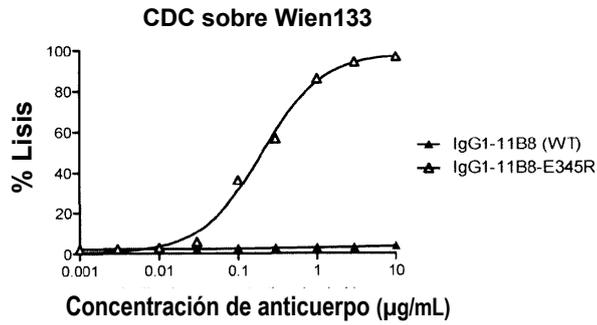
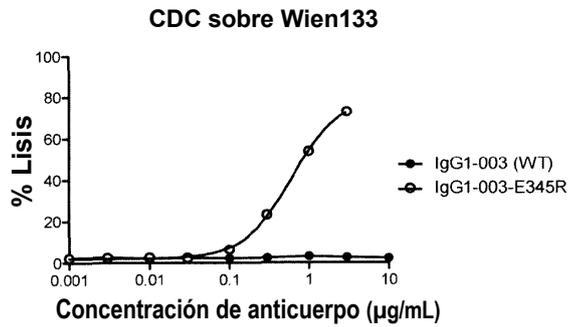
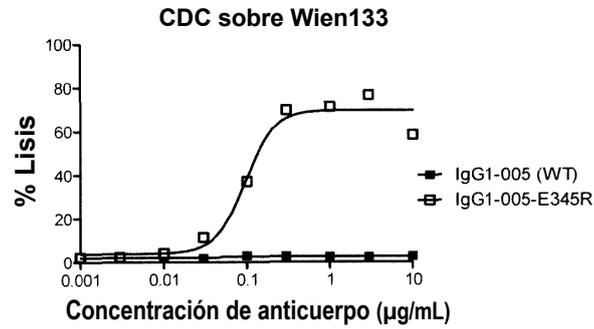


Figura 13

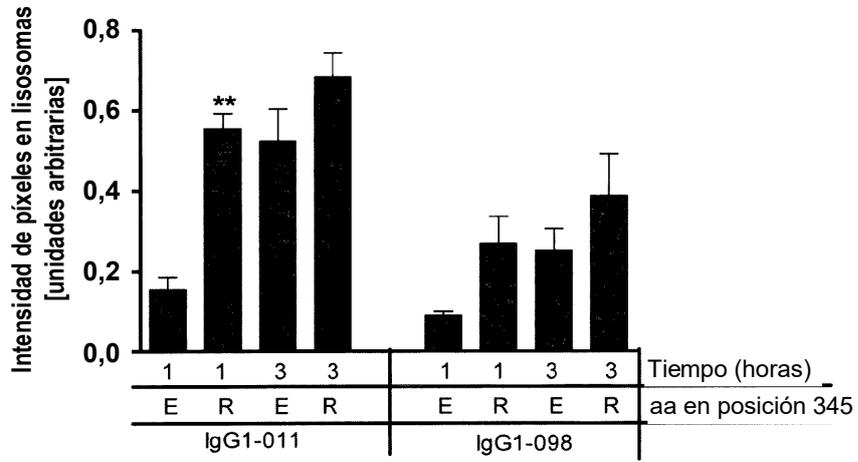


Figura 14A

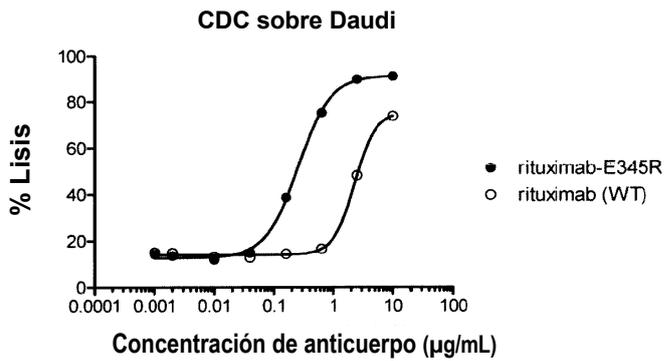


Figura 14B

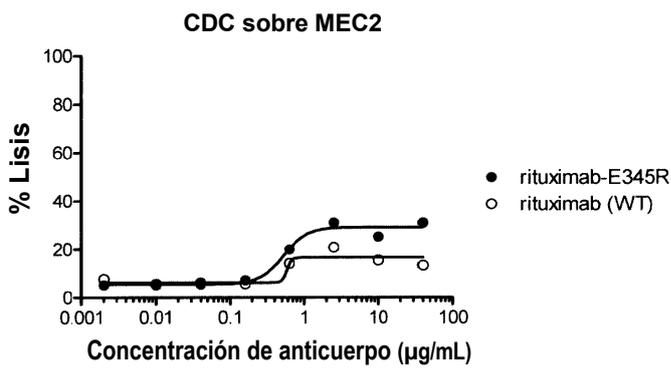


Figura 14C

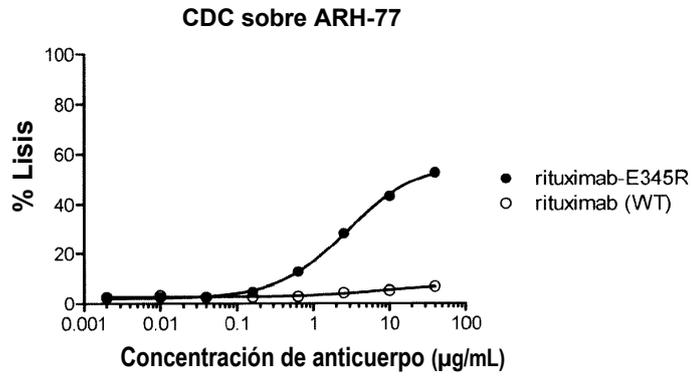


Figura 14D

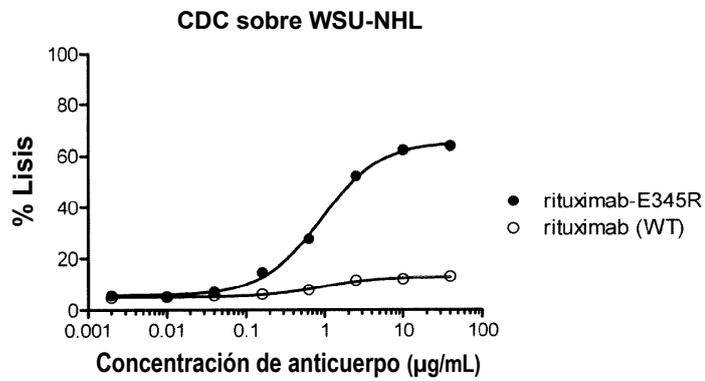


Figura 14E

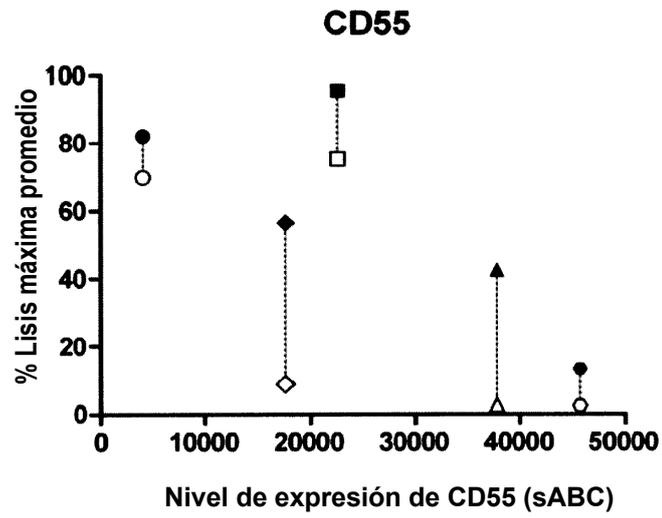
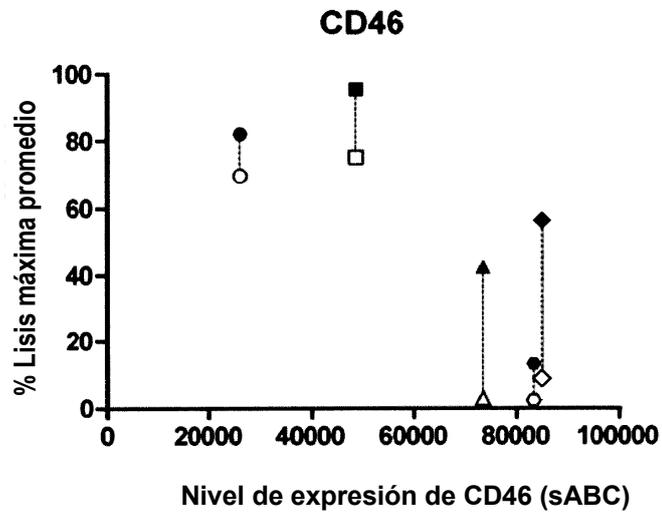
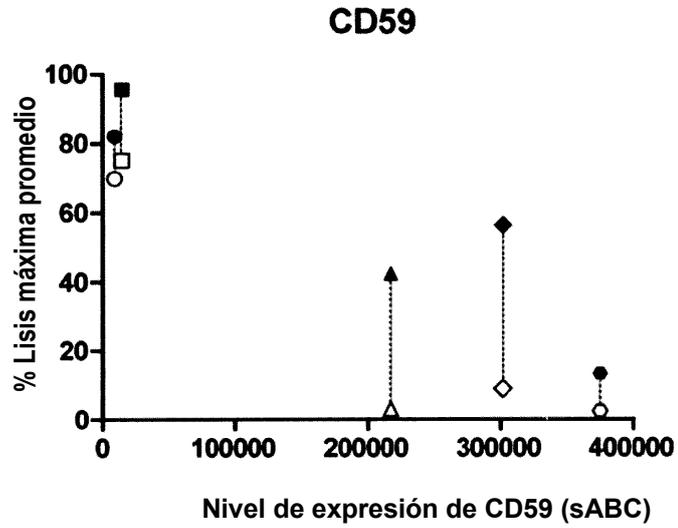


Figura 14E continuación



- | | | |
|-----------|--|-----------------|
| ● Daudi | | rituximab-E345R |
| ■ WIL2-S | | |
| ▲ ARH-77 | | |
| ◆ WSU-NHL | | |
| ● MEC-2 | | |
| ○ Daudi | | rituximab (WT) |
| □ WIL2-S | | |
| △ ARH-77 | | |
| ◇ WSU-NHL | | |
| ○ MEC-2 | | |

Figura 15

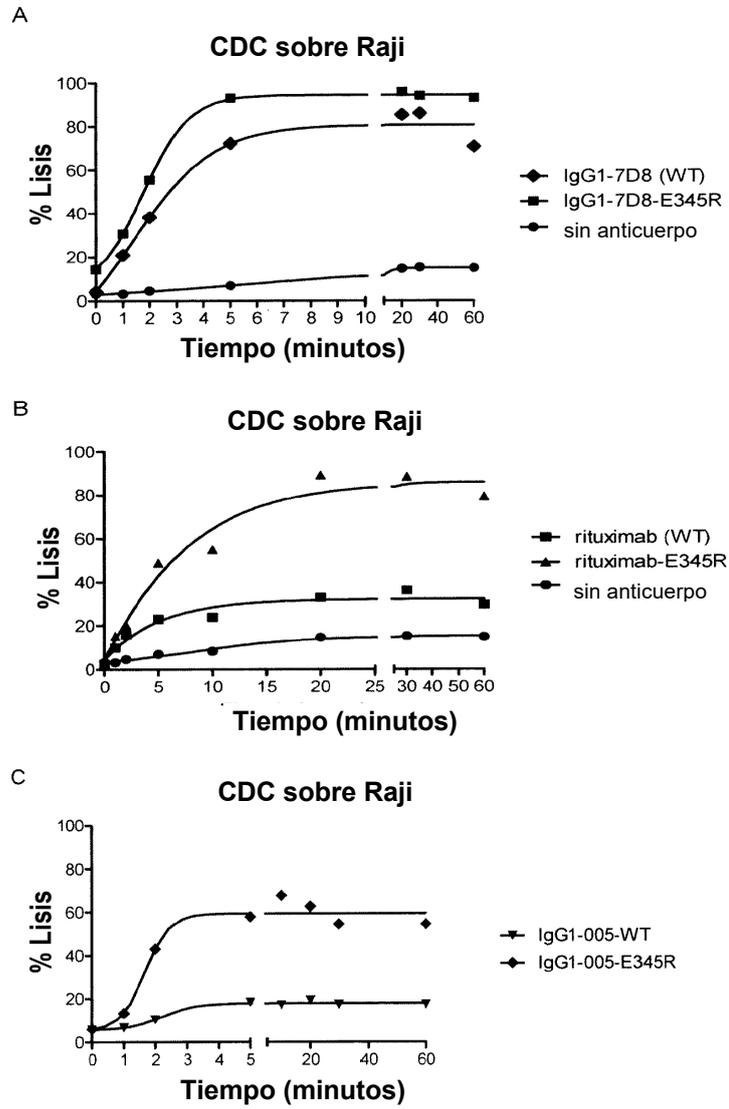


Figura 15 (continuación)

D

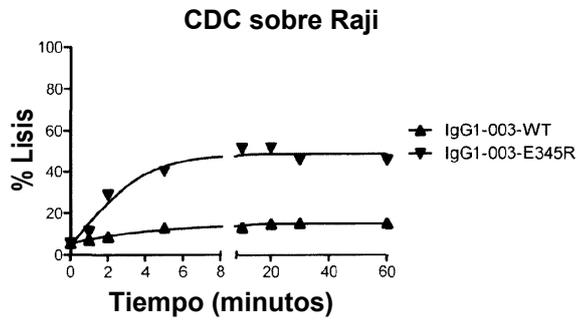


Figura 16

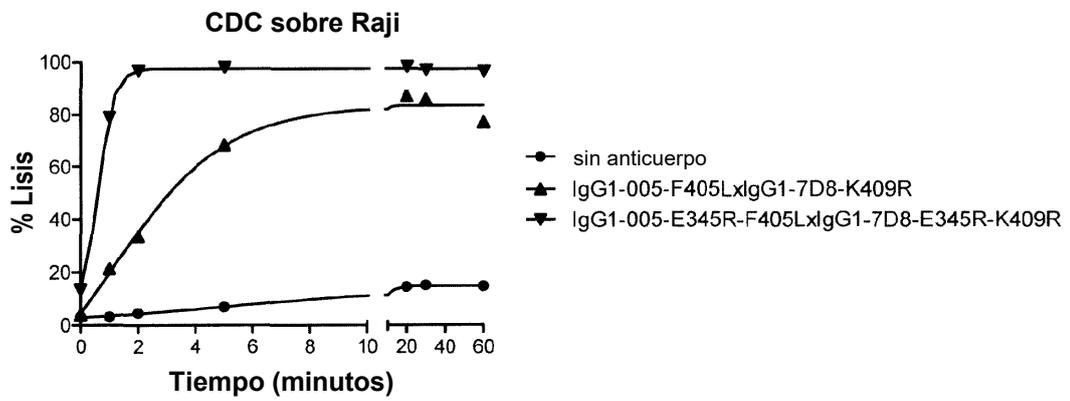


Figura 17

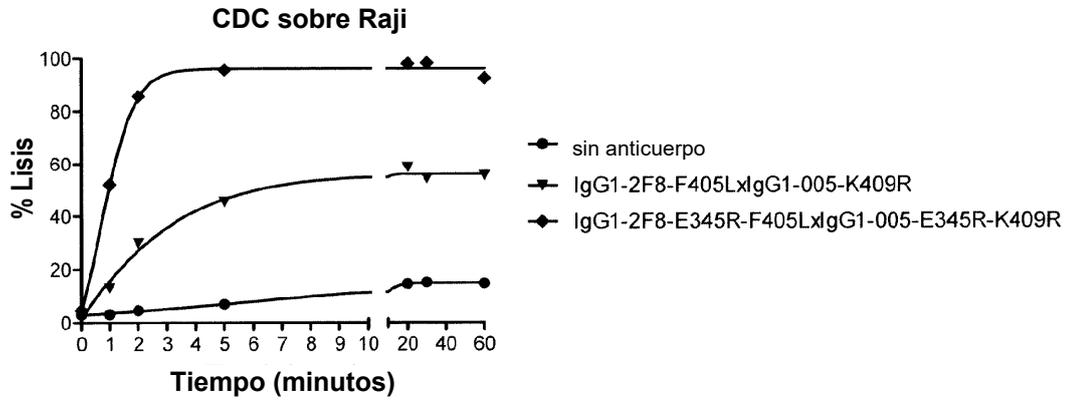


Figura 18

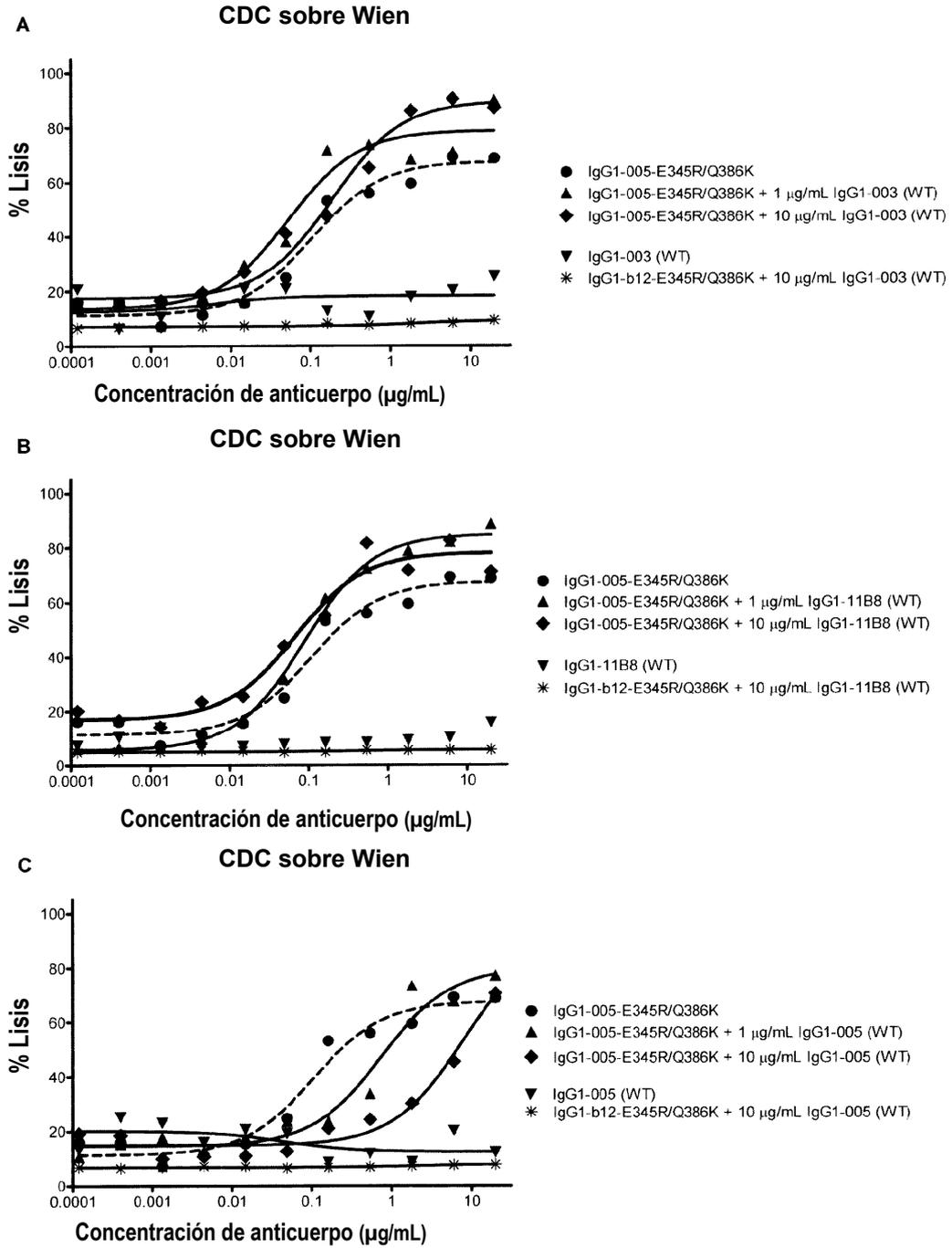


Figura 18 (continuación)

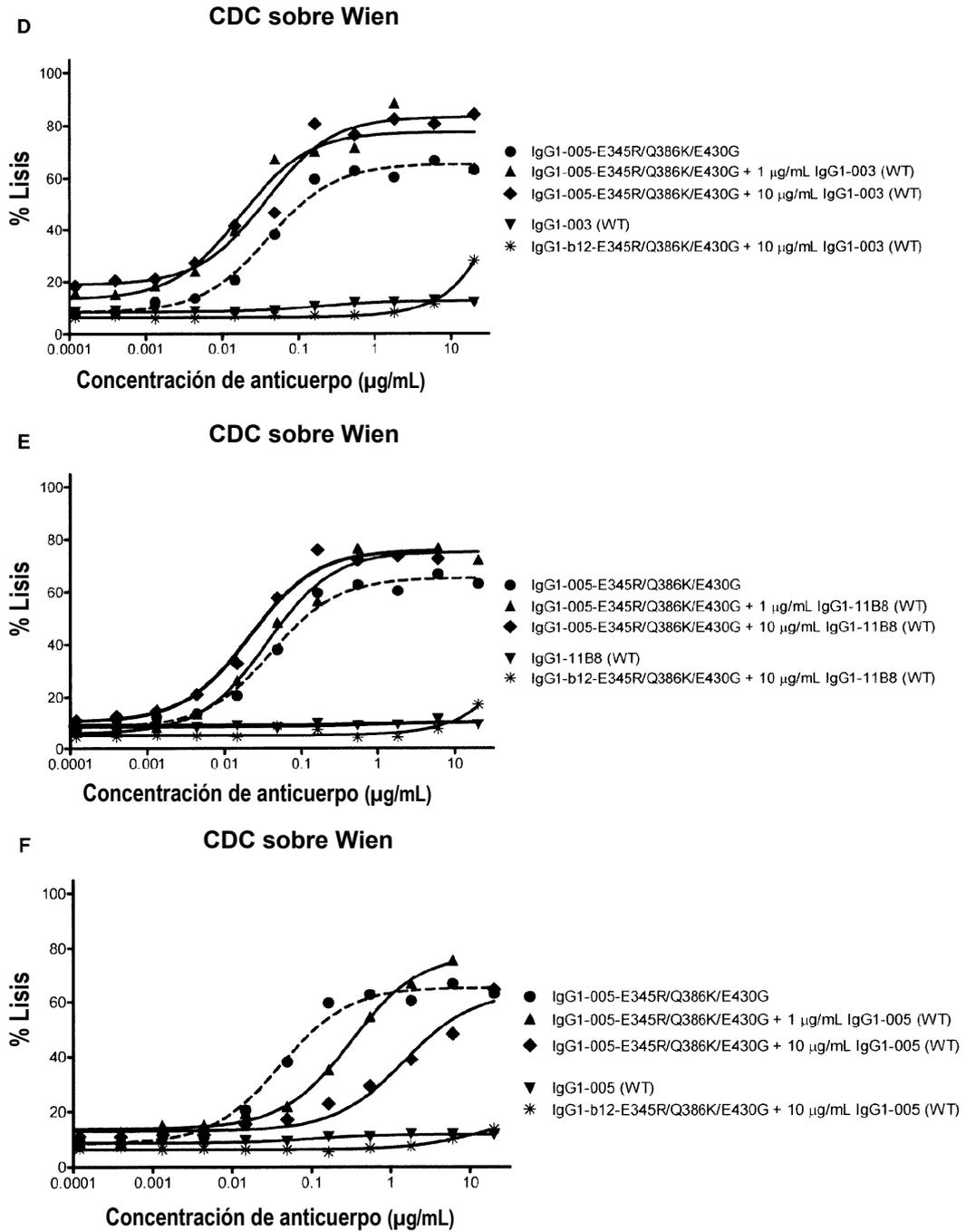


Figura 19

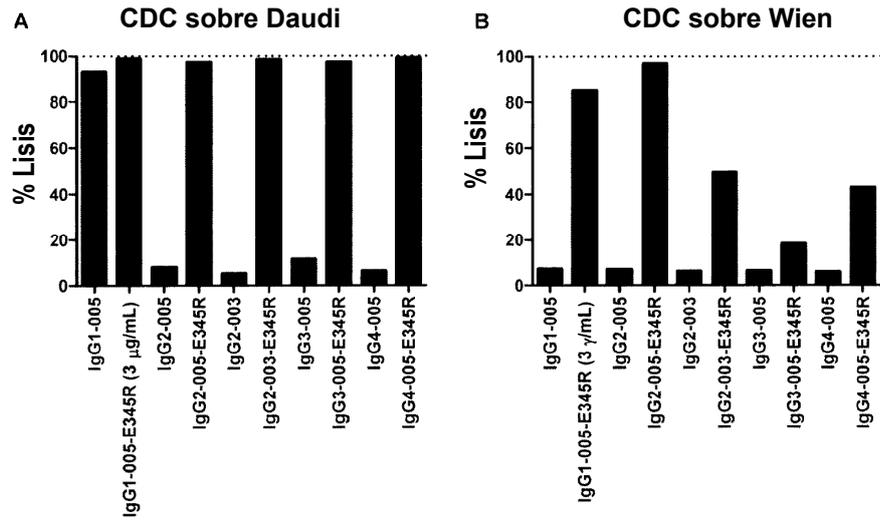


Figura 20

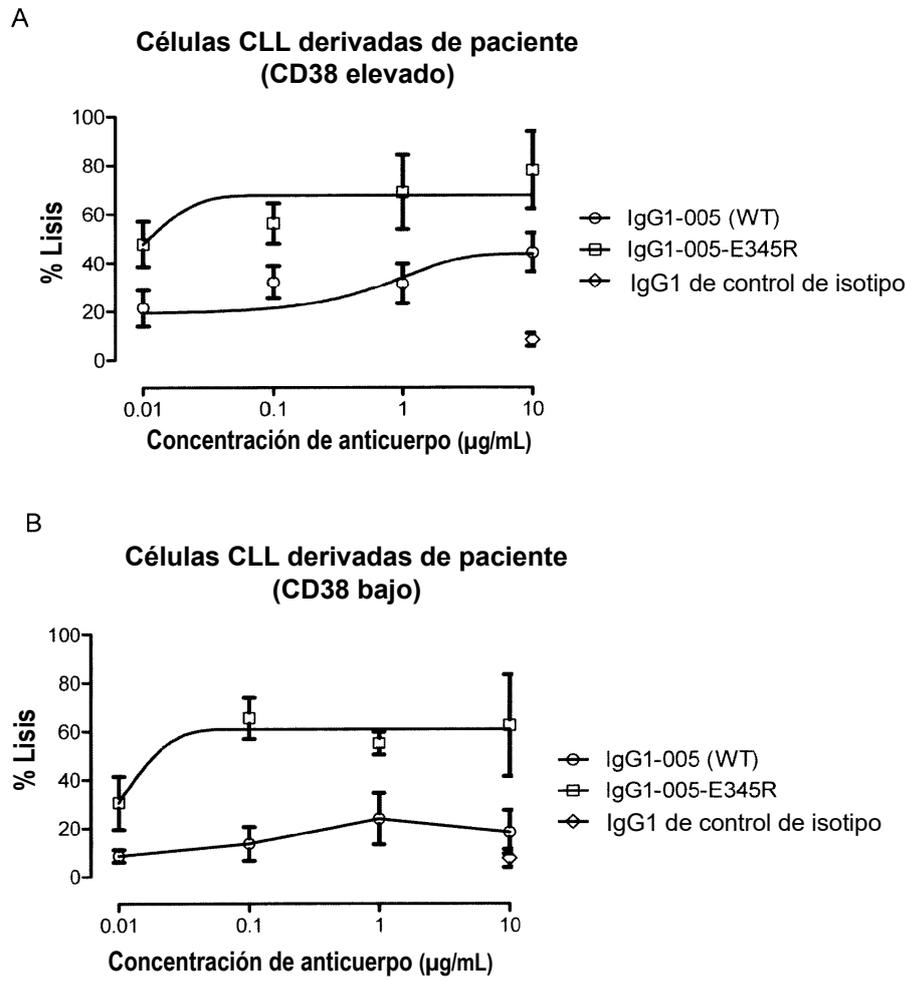


Figura 21

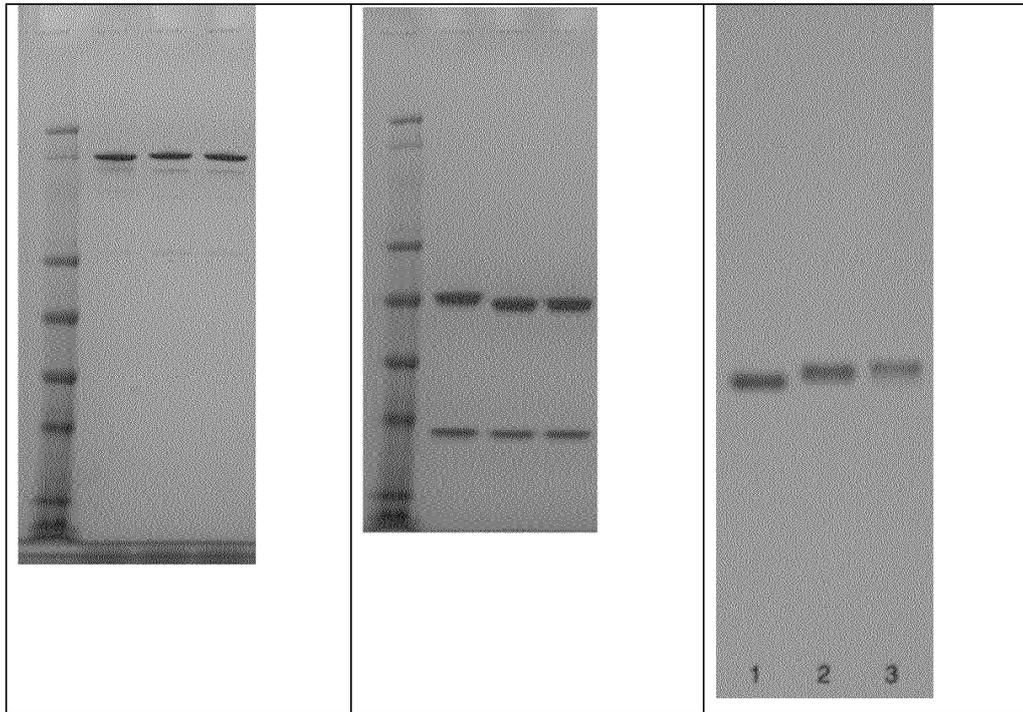


Figura 22

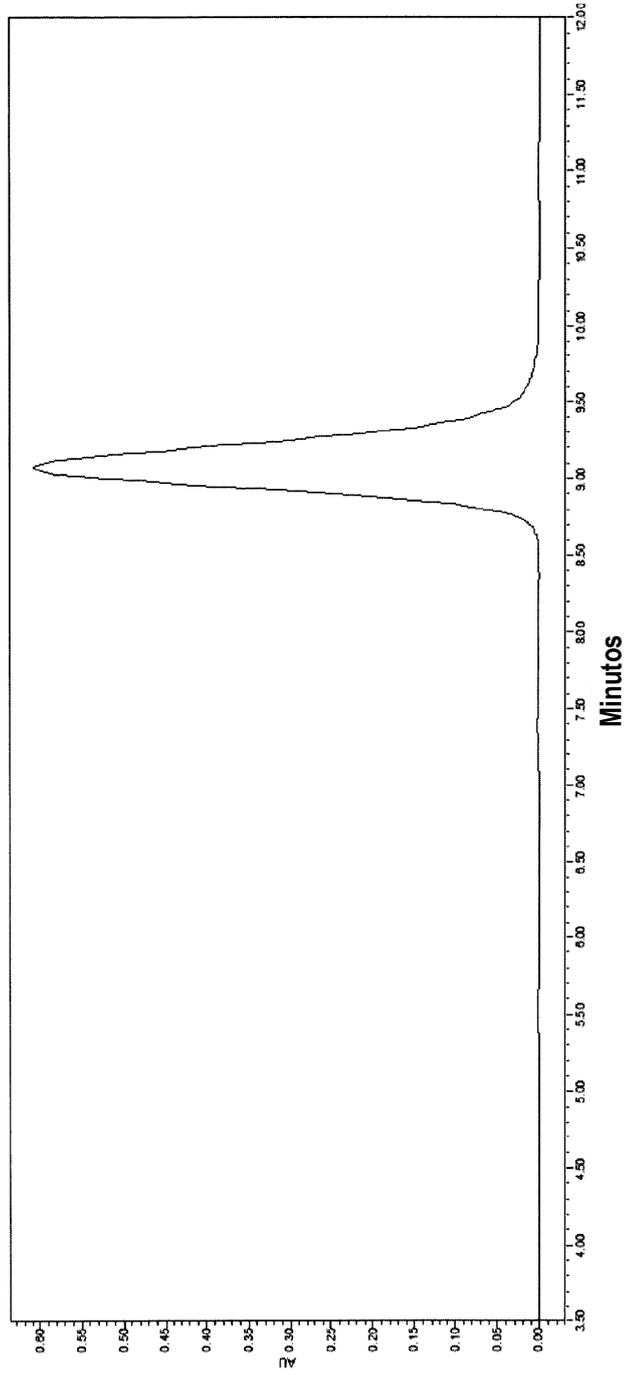


Figura 23

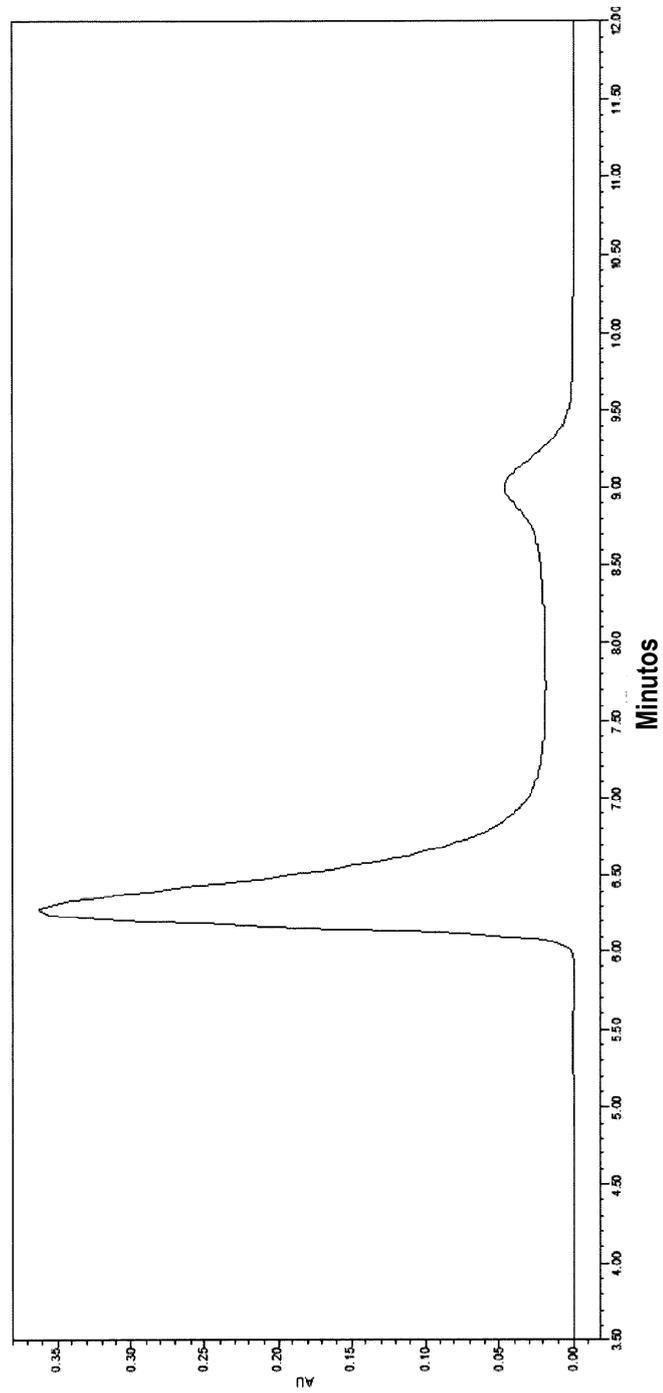


Figura 24

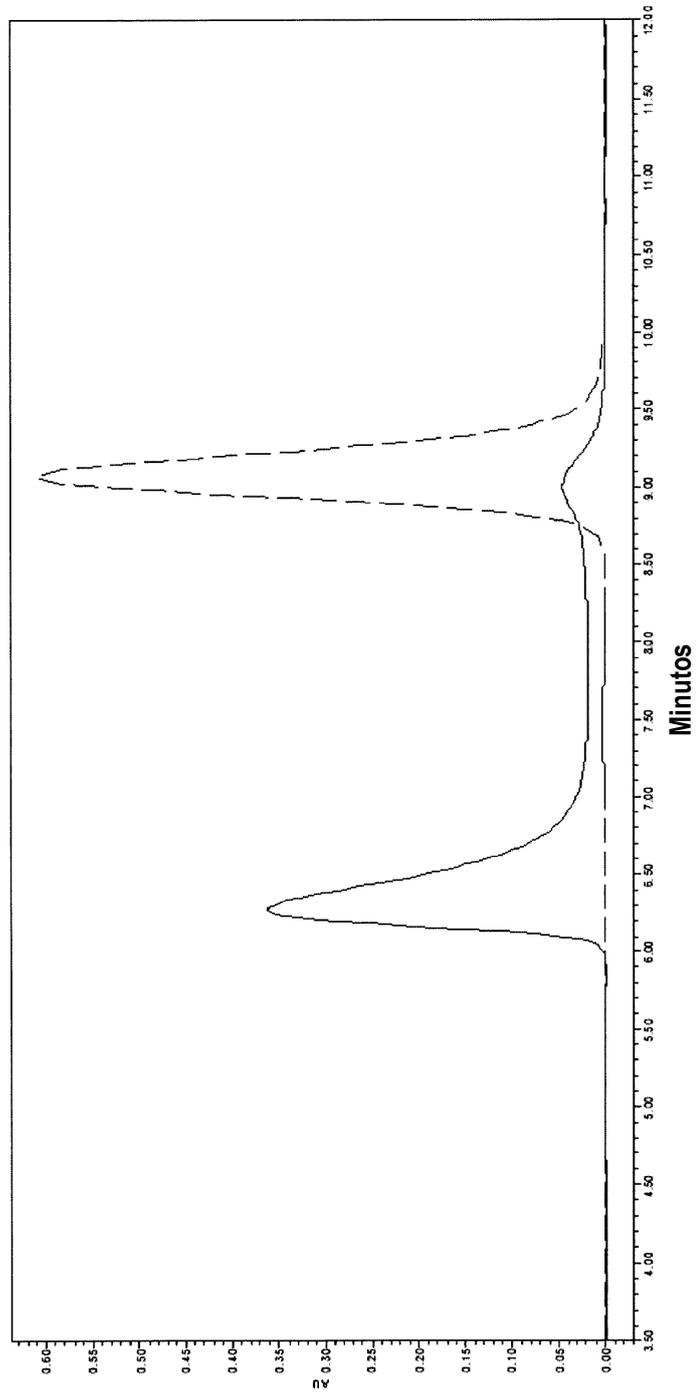


Figura 25

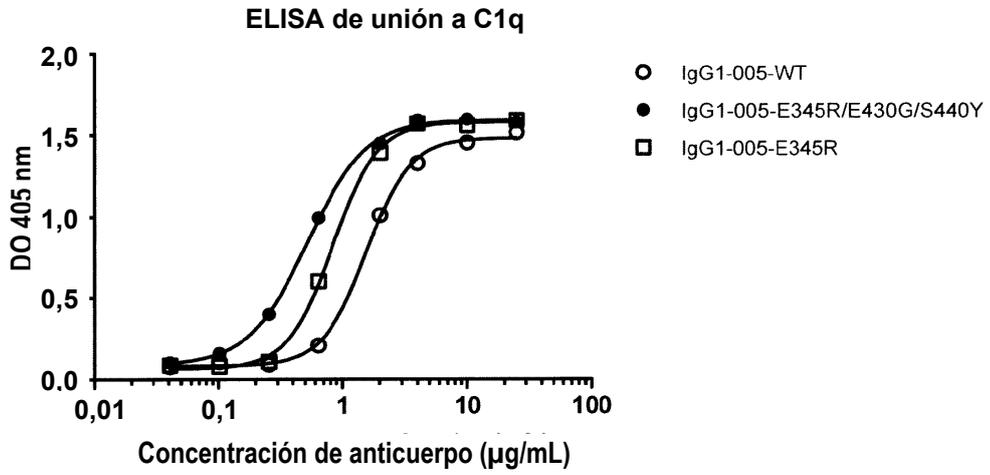


Figura 26

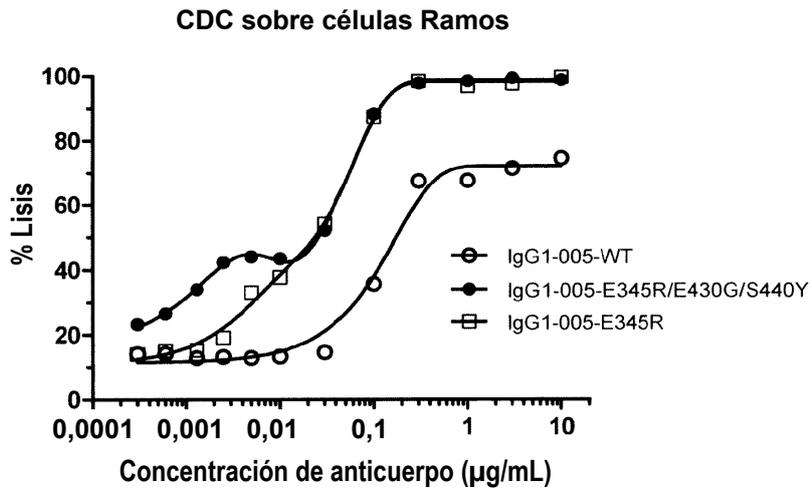


Figura 27

Ensayo informador de ADCC sobre células Raji

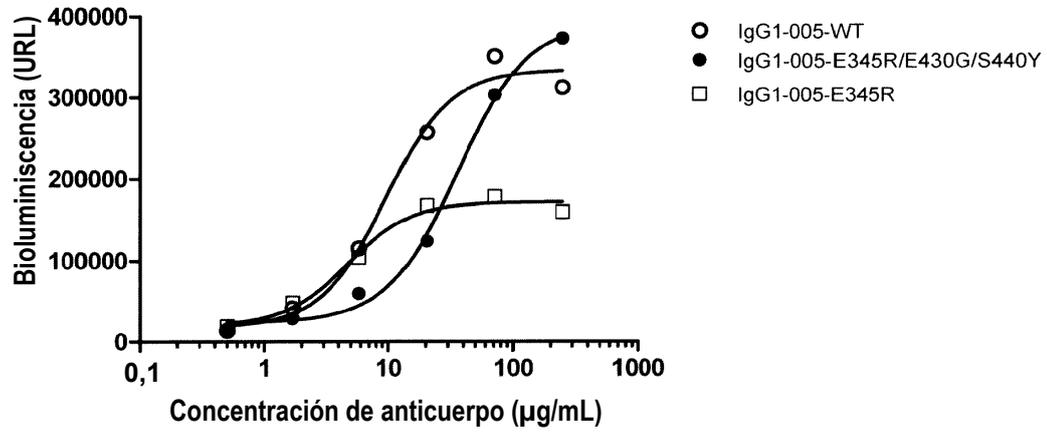


Figura 28

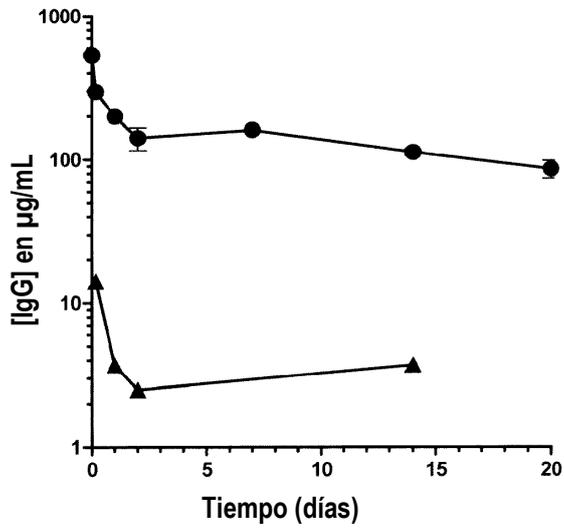


Figura 29

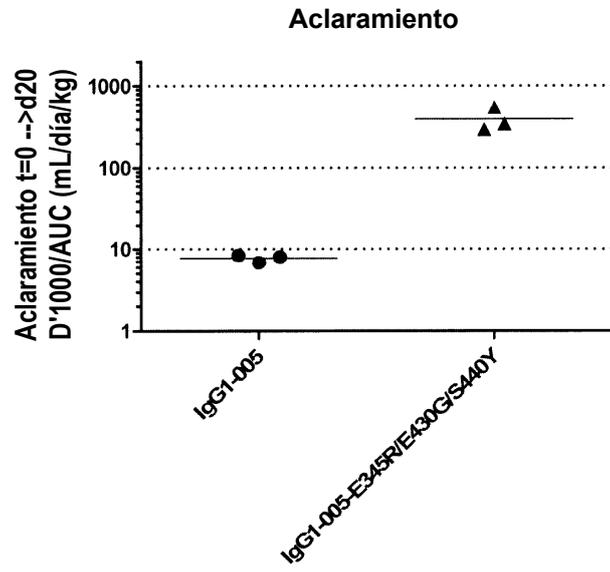


Figura 30

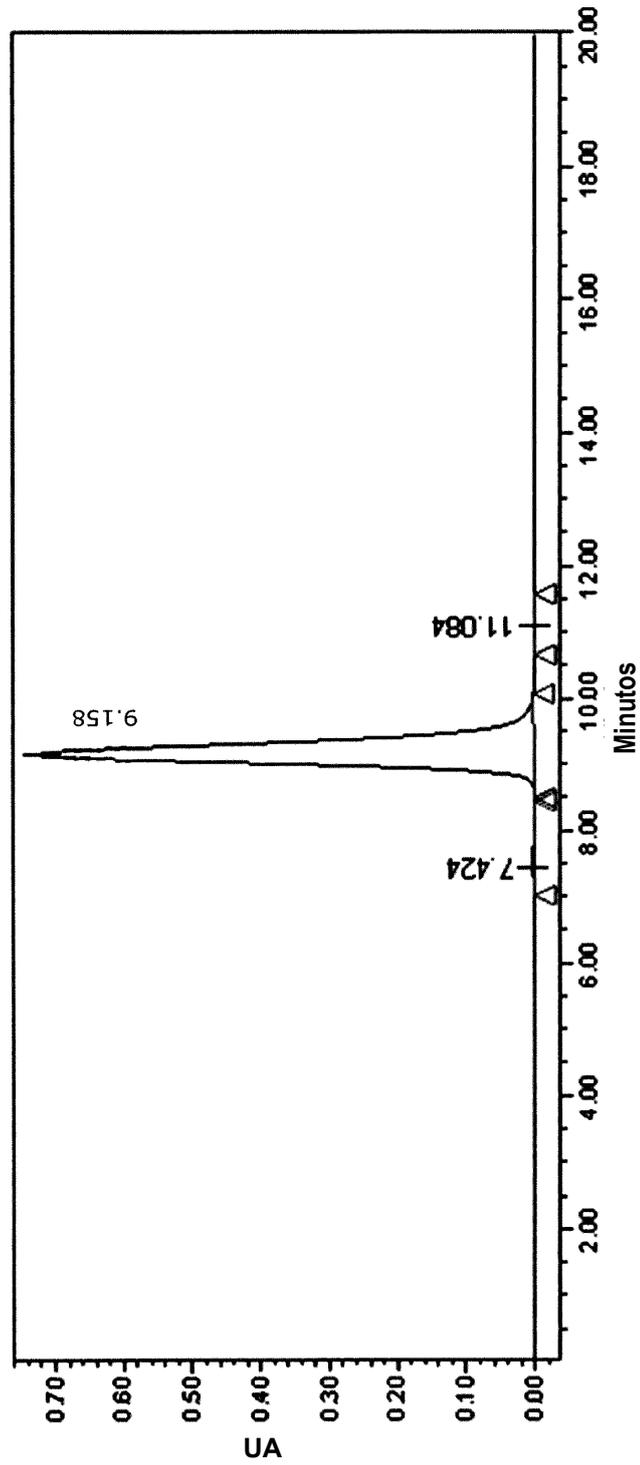


Figura 31

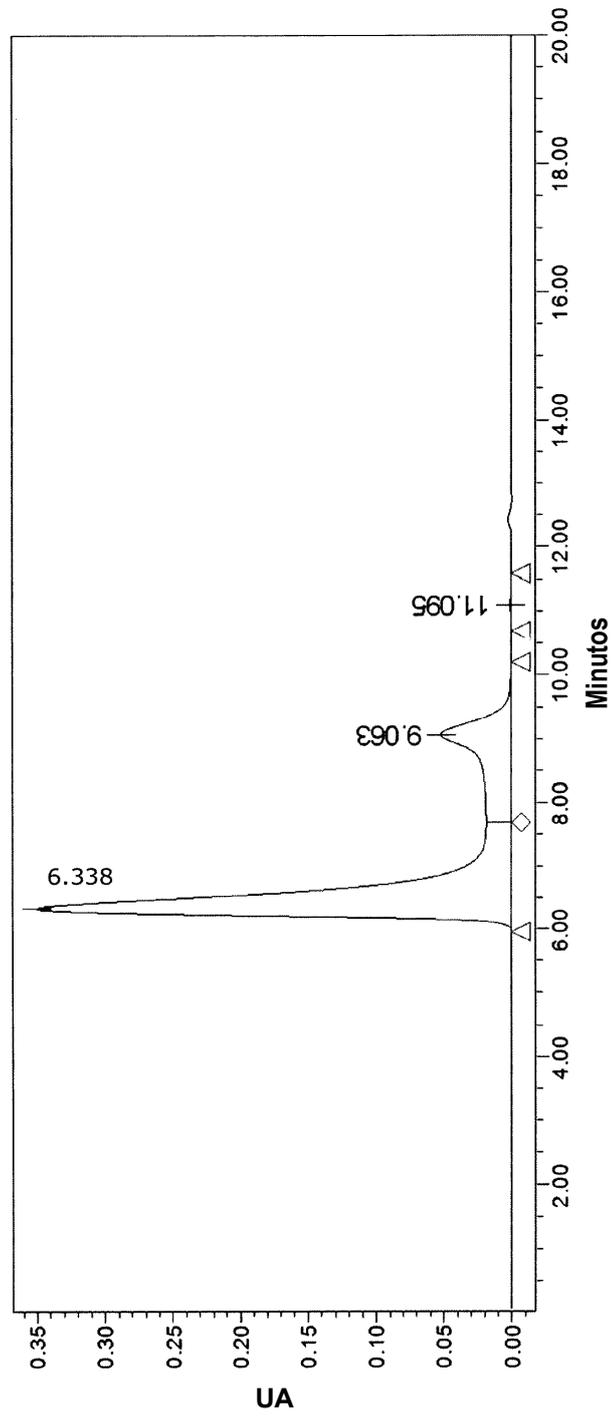


Figura 32

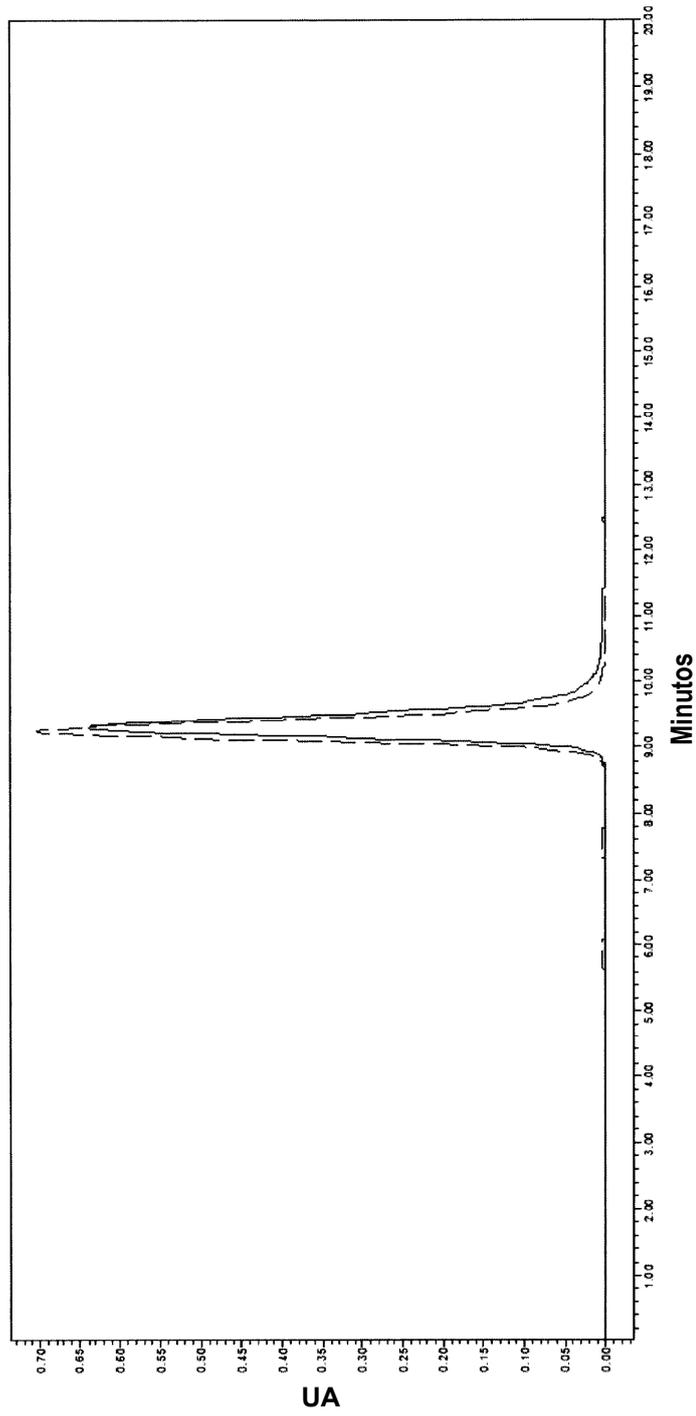


Figura 33

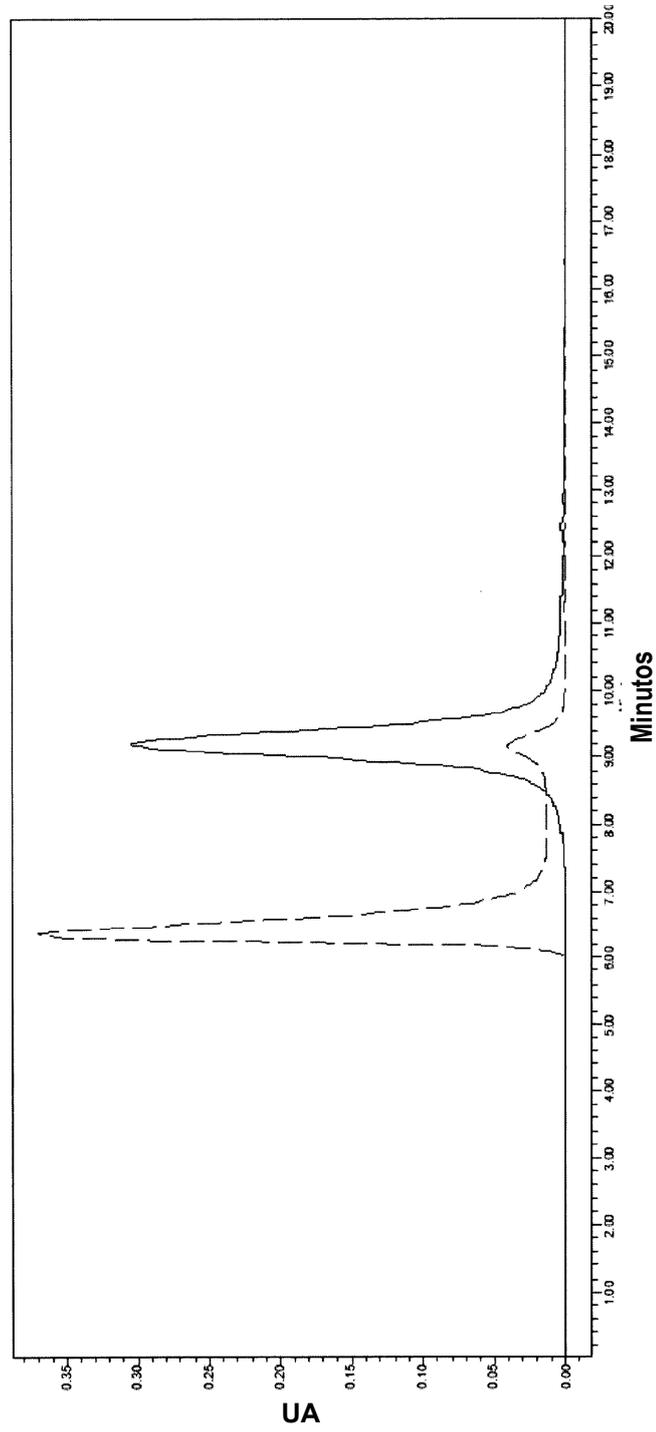


Figura 34A

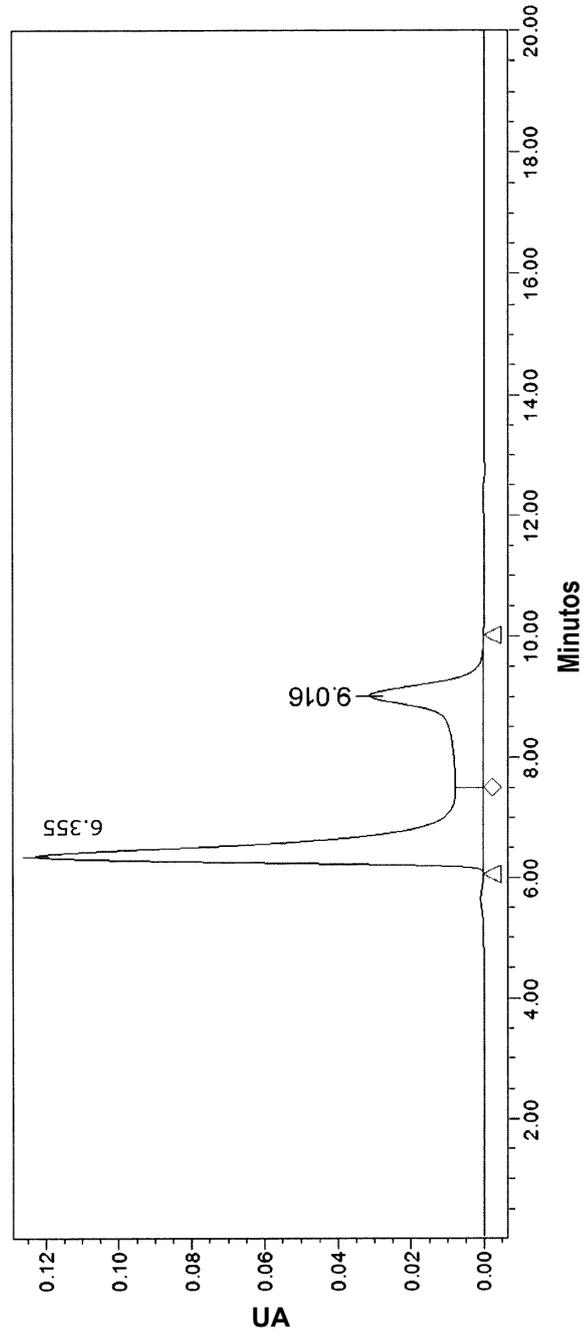


Figura 34B

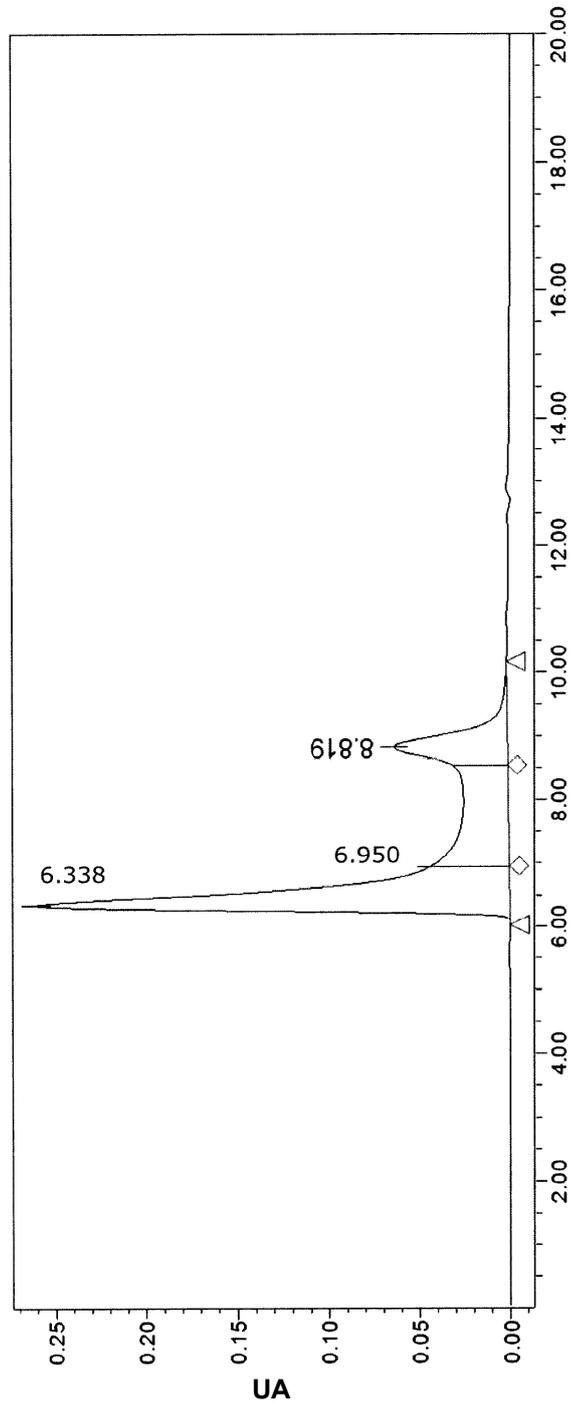


Figura 34C

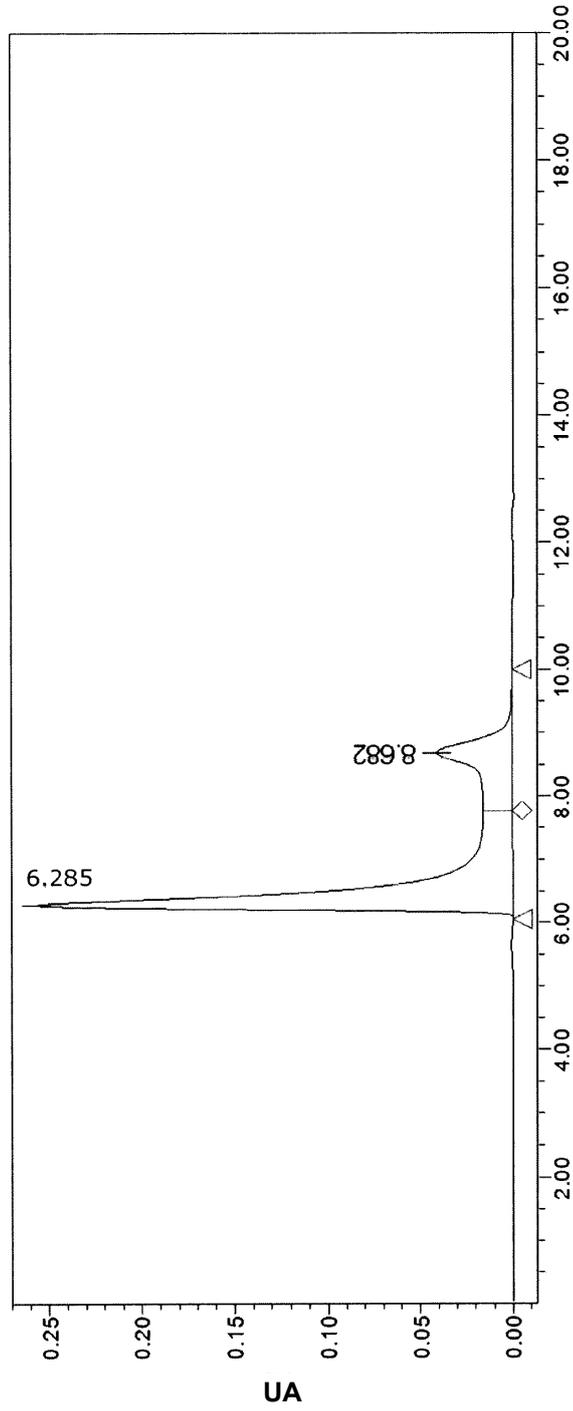


Figura 34D

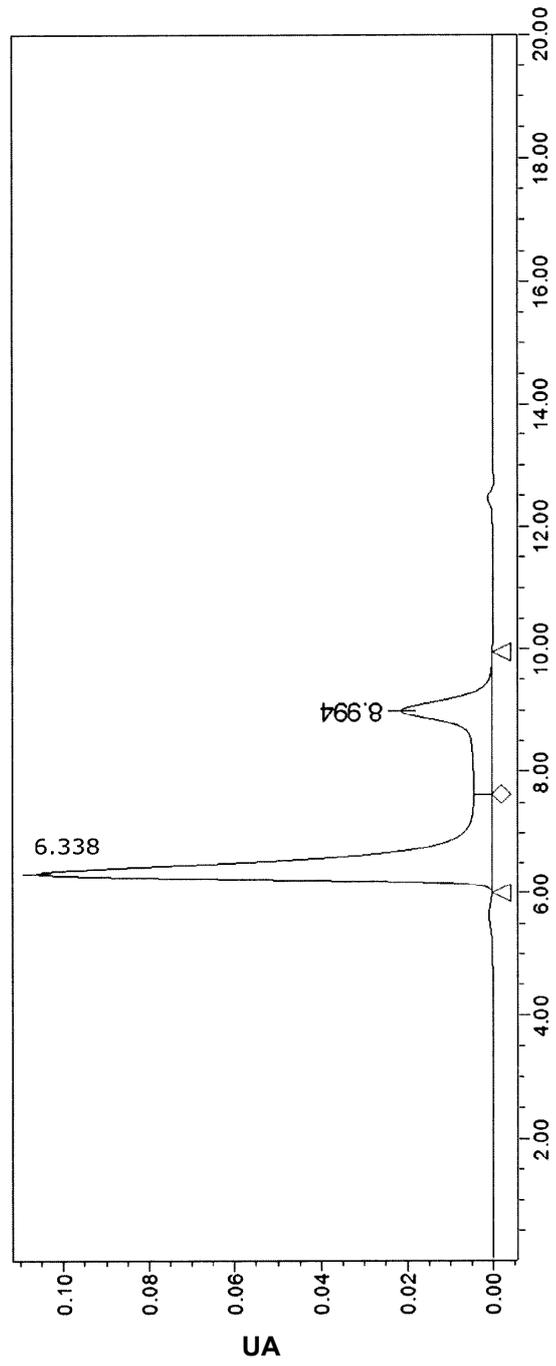
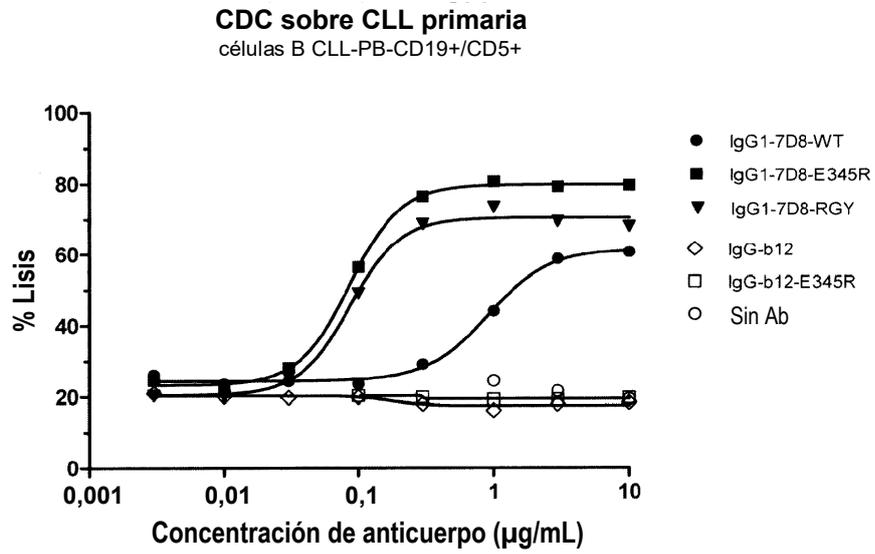


Figura 35

A



B

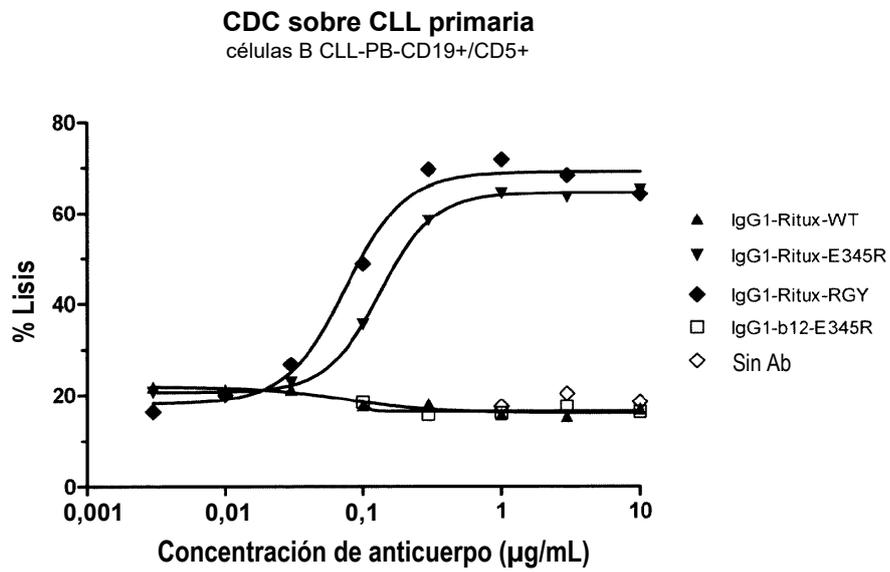


Figura 36A

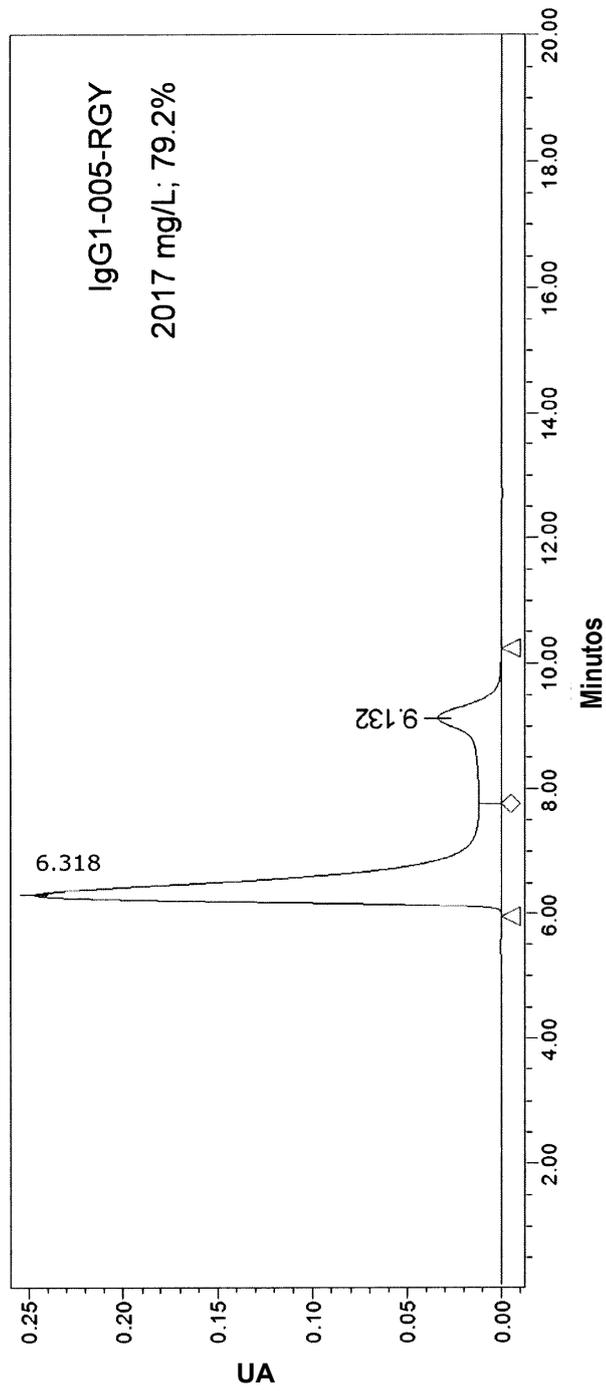


Figura 36B

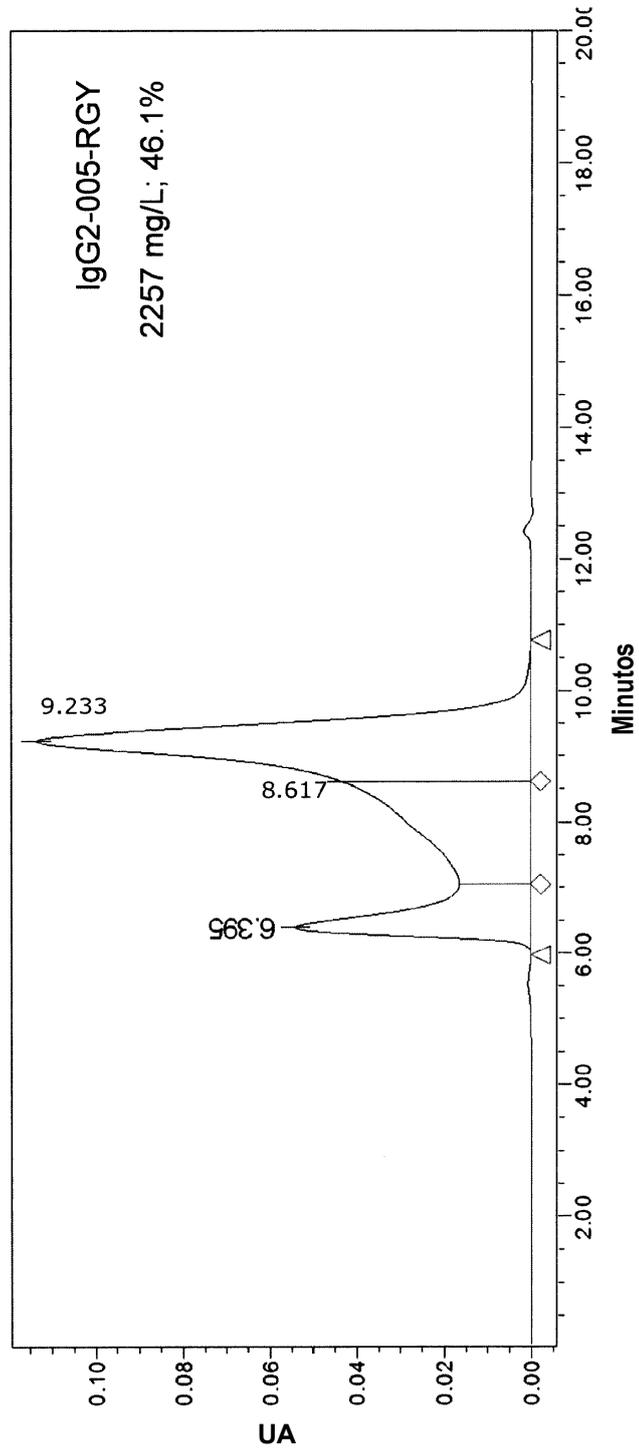


Figura 36C

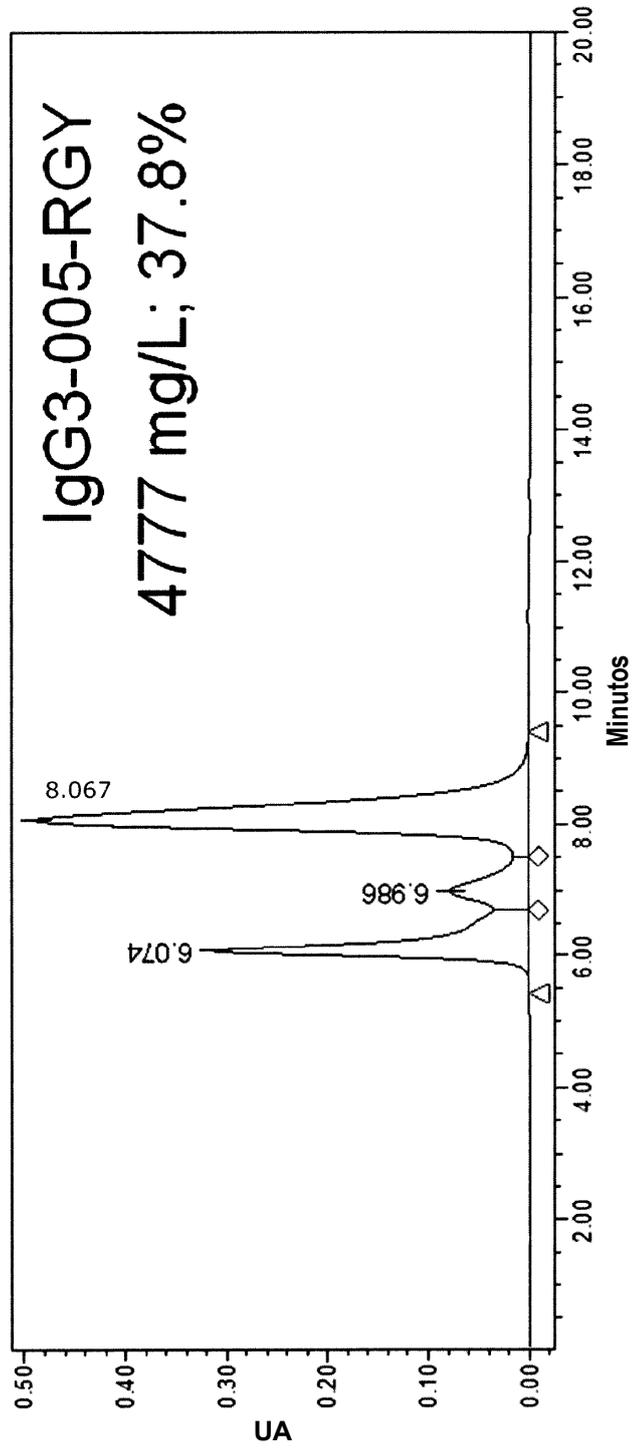


Figura 36D

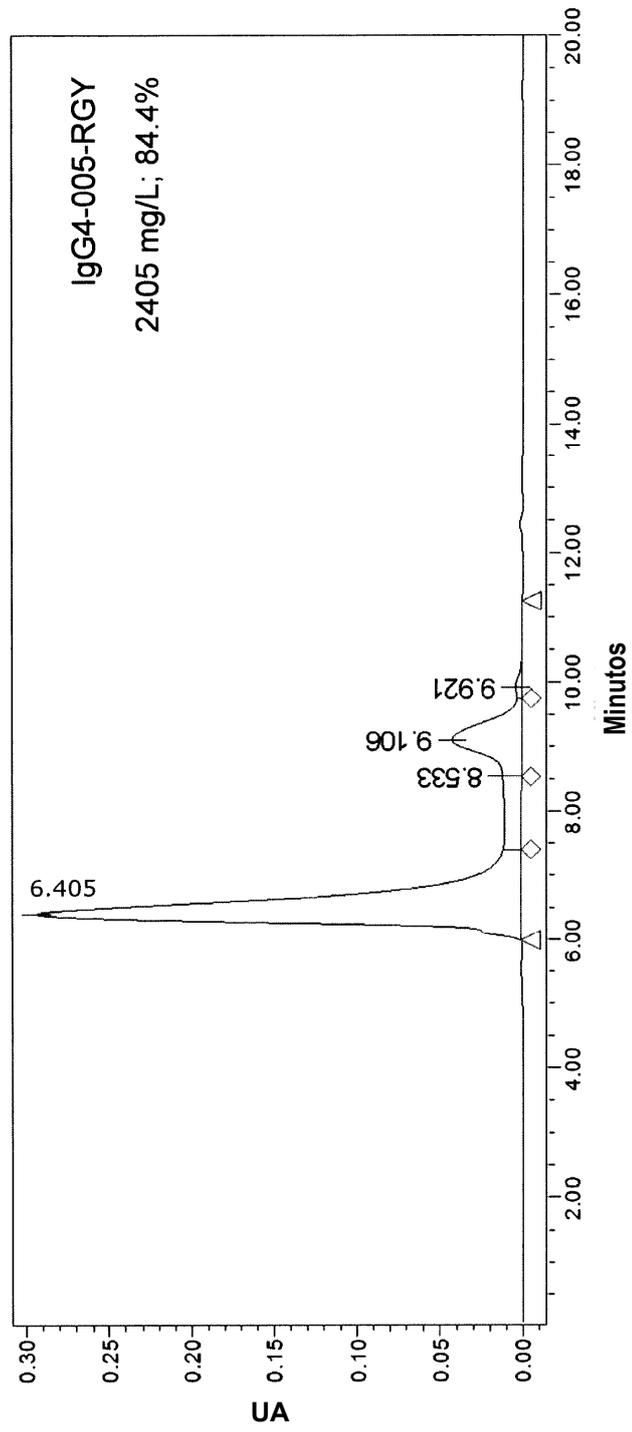


Figura 37

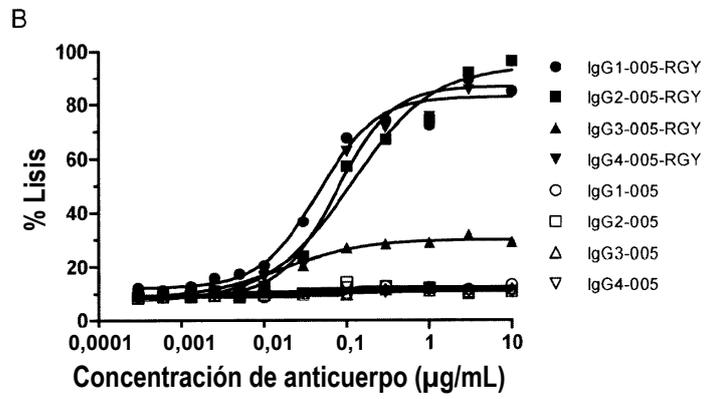
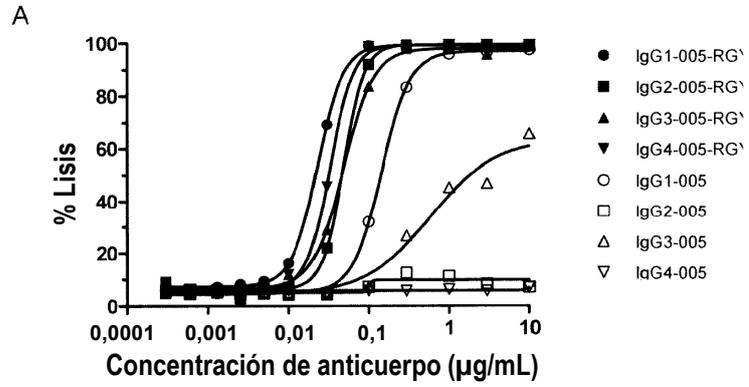


Figura 38A

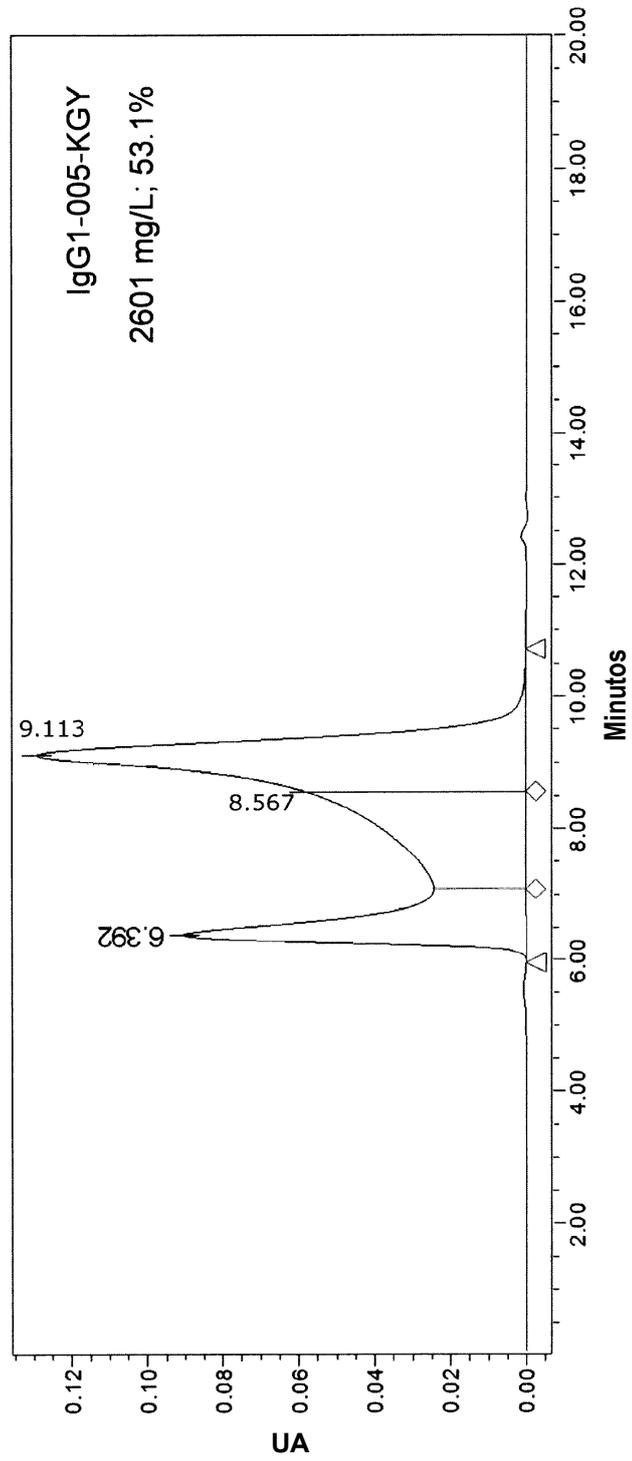


Figura 38B

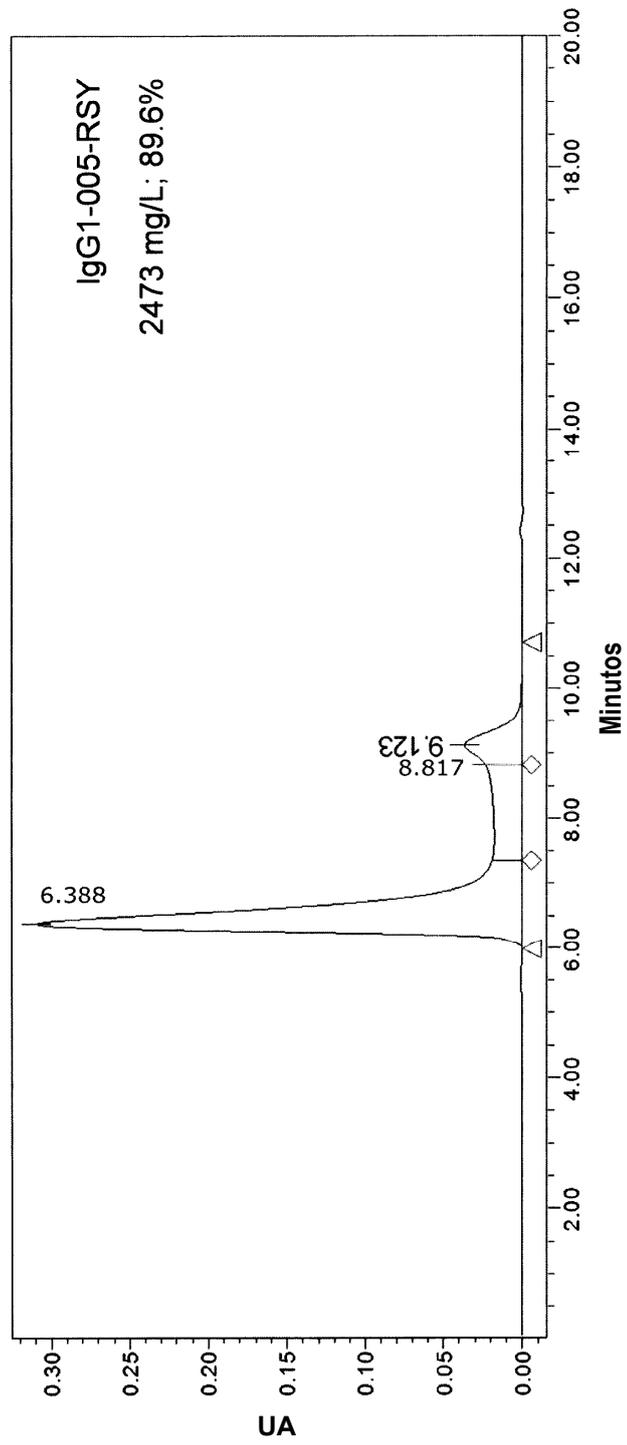


Figura 38C

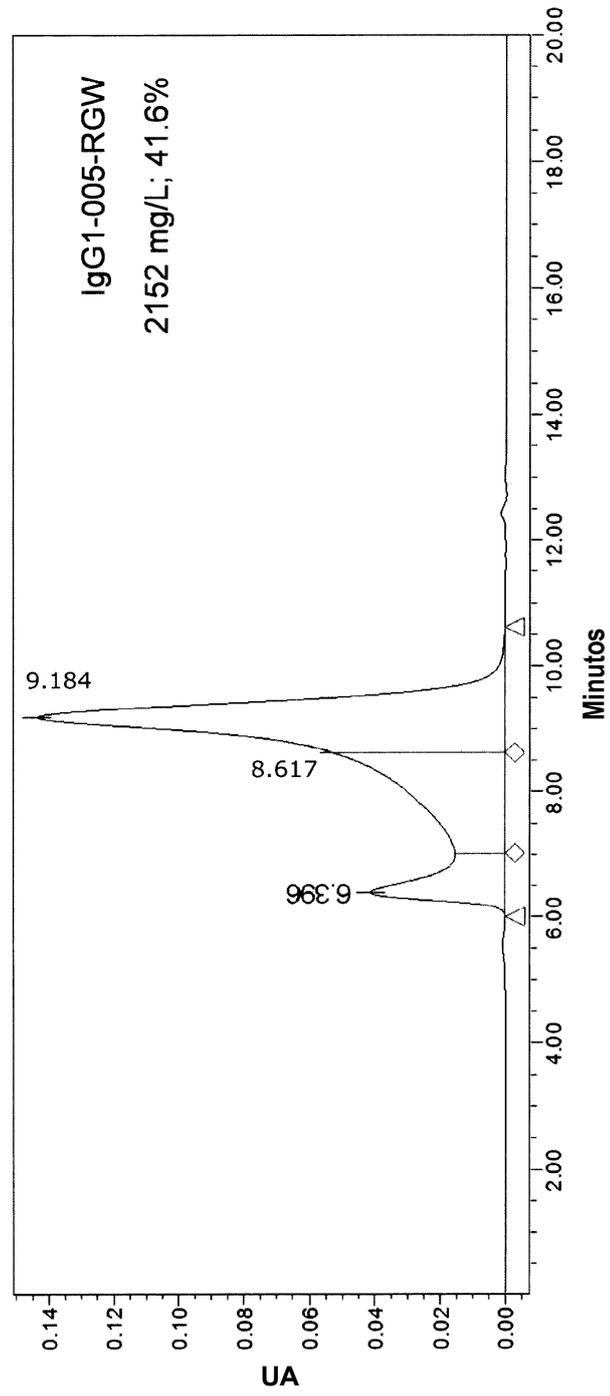


Figura 38D

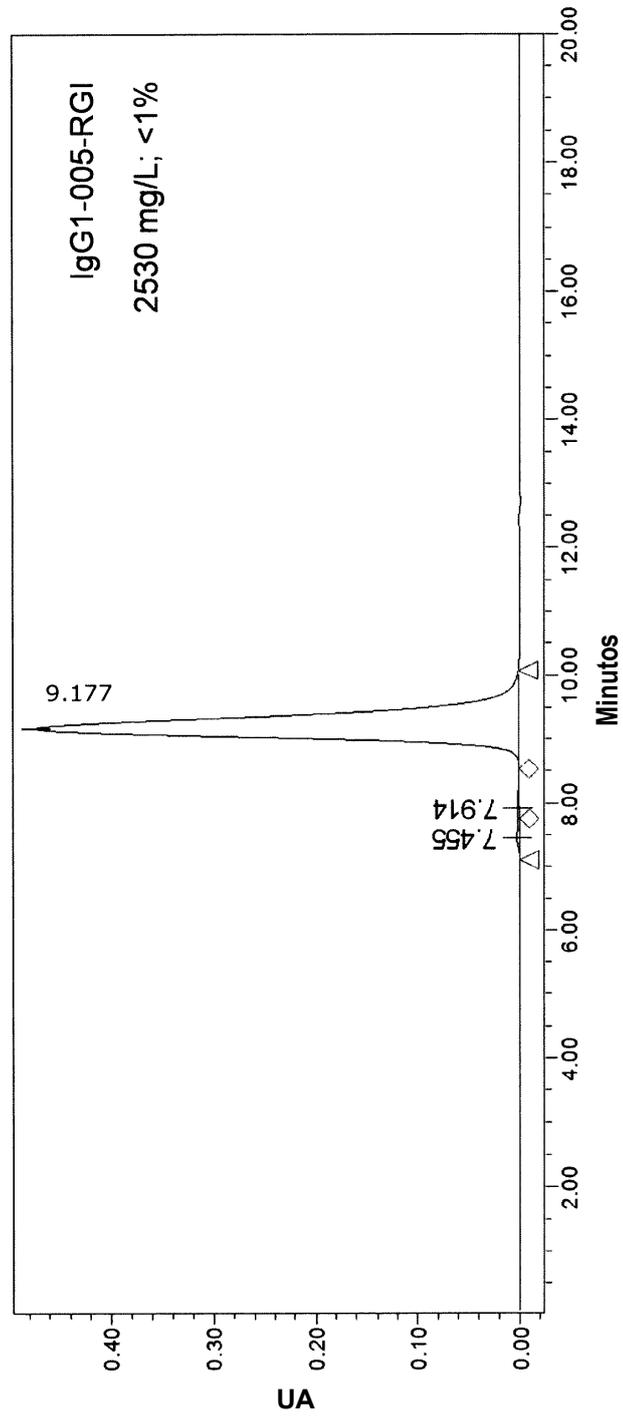
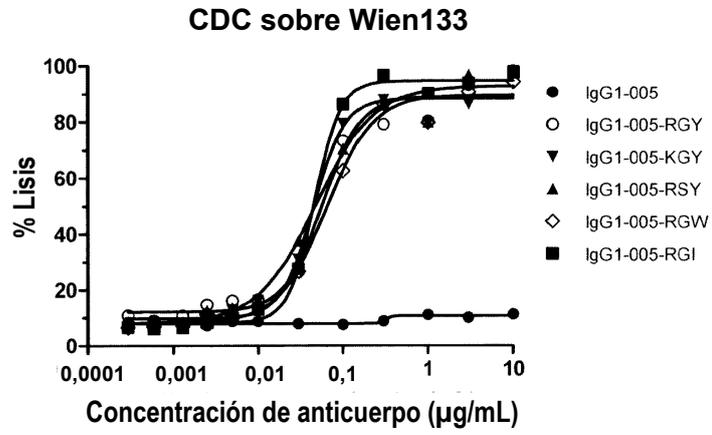


Figura 39

A



B

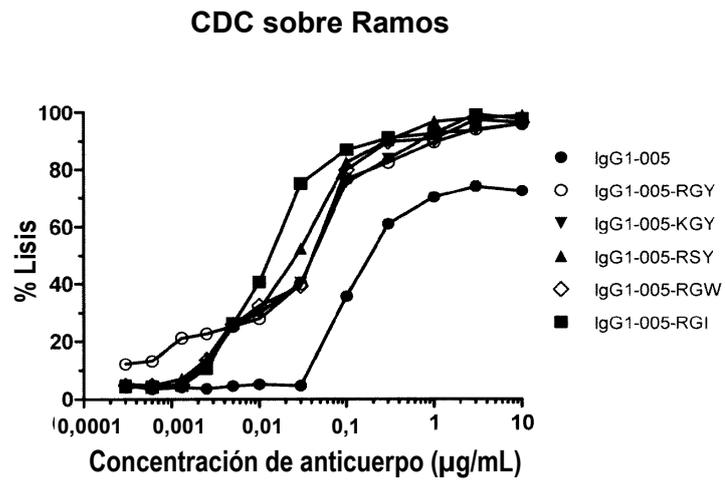


Figura 40

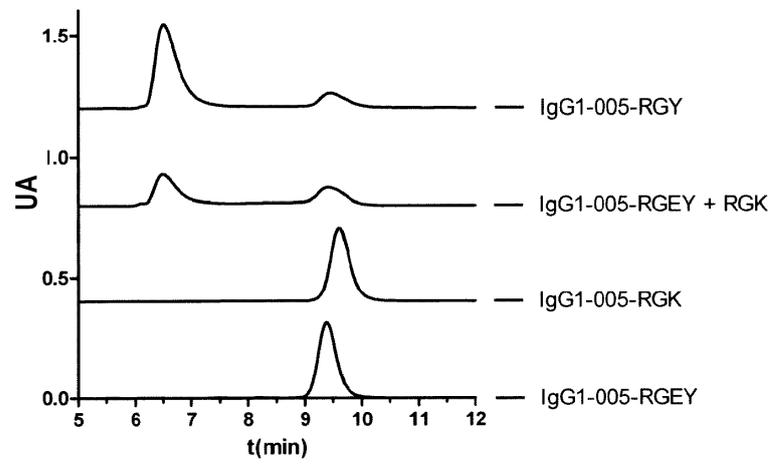


Figura 41

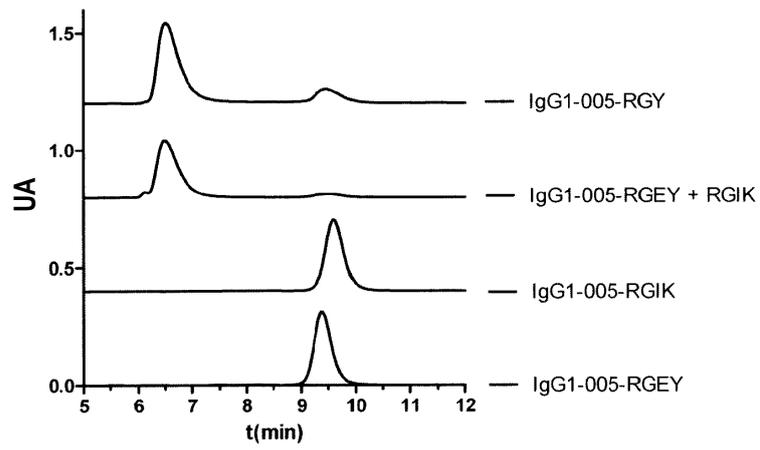


Figura 42

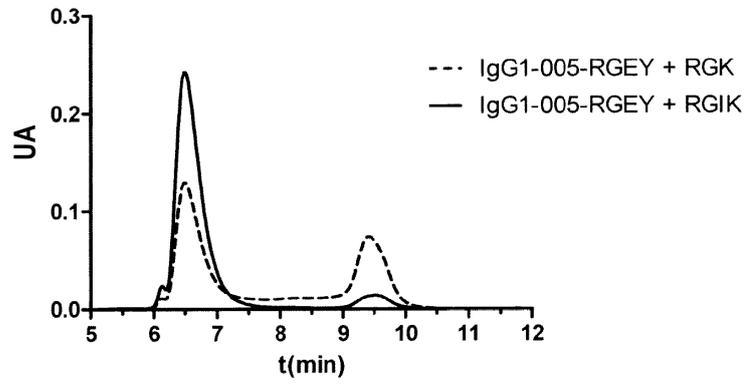


Figura 43

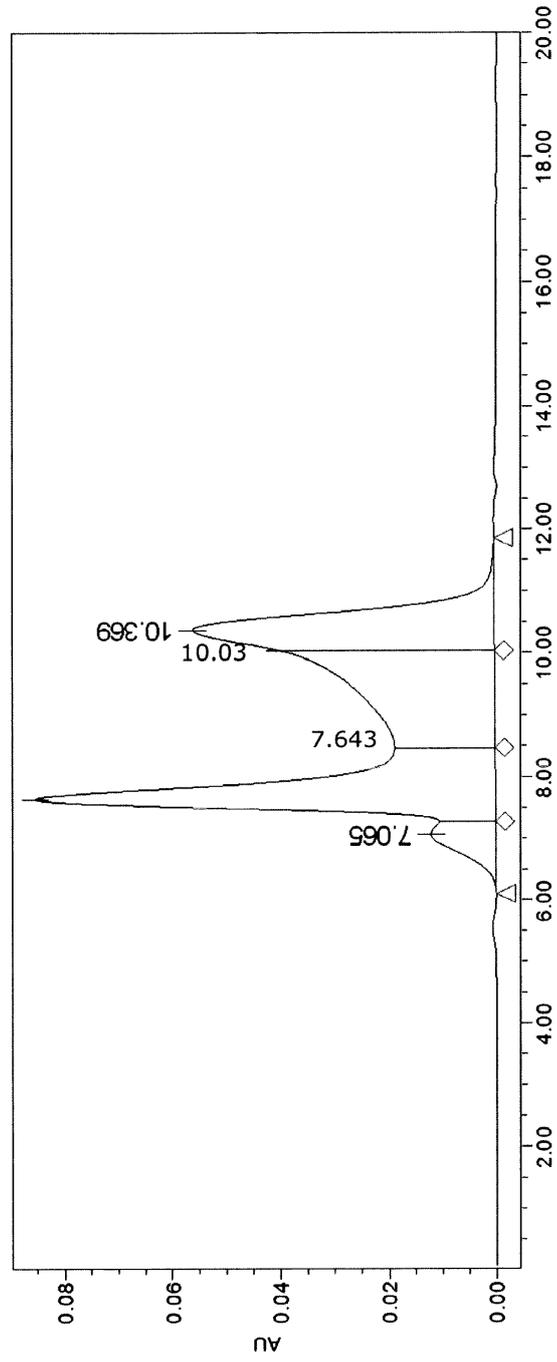
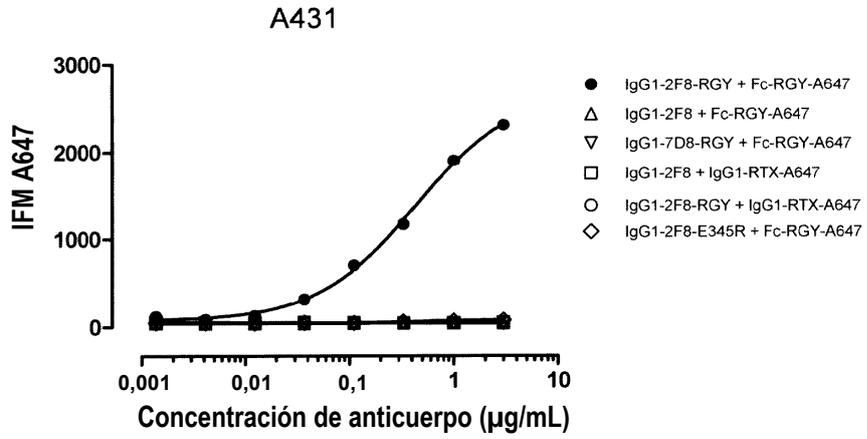


Figura 44

A



B

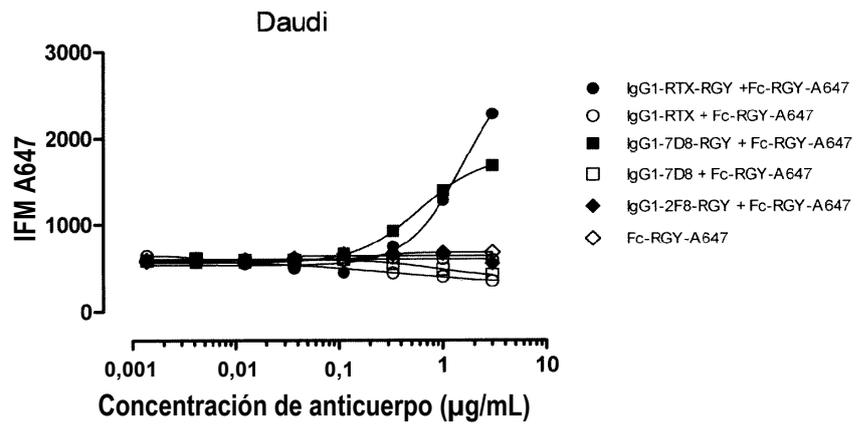
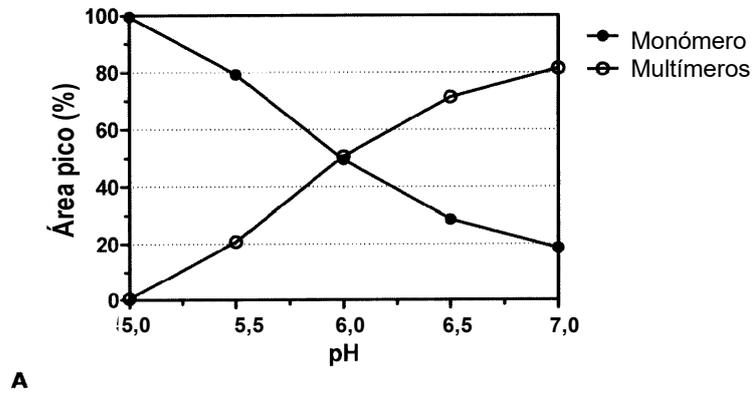
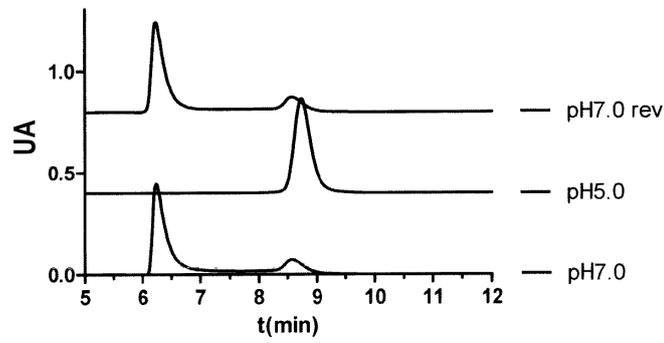


Figura 45



A



B

Figura 46

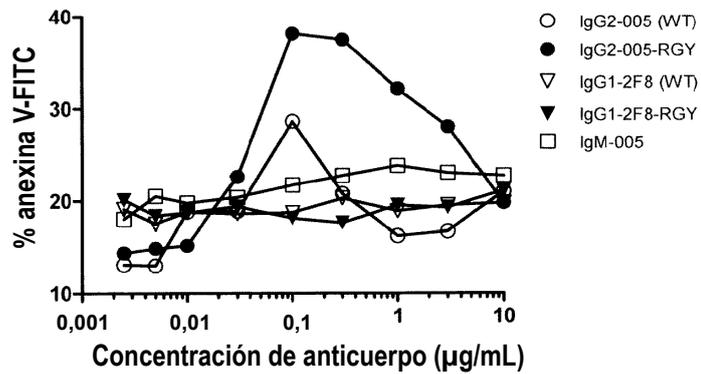


Figura 47

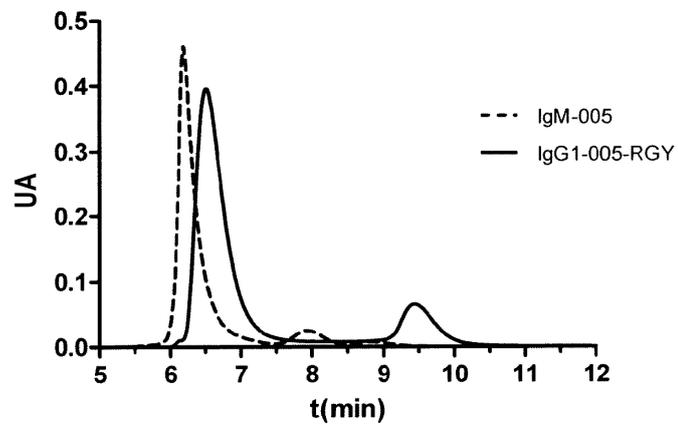
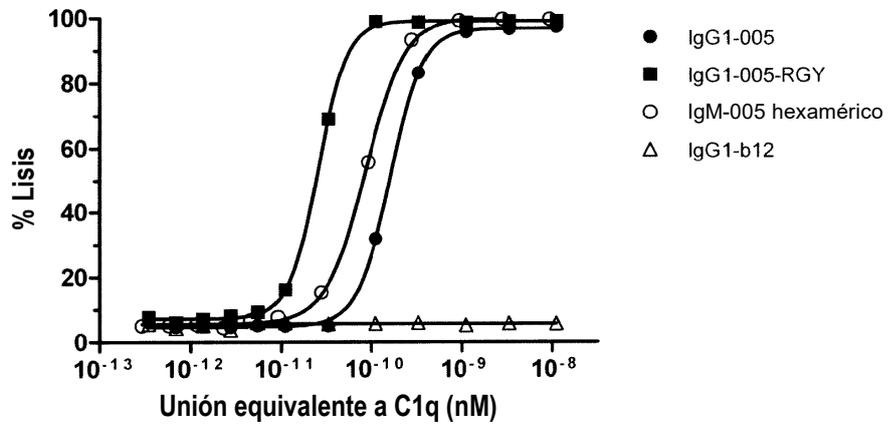


Figura 48

A



B

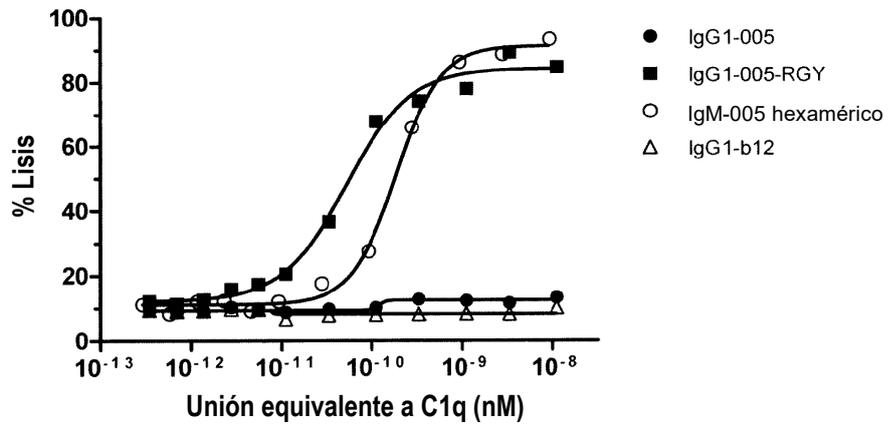
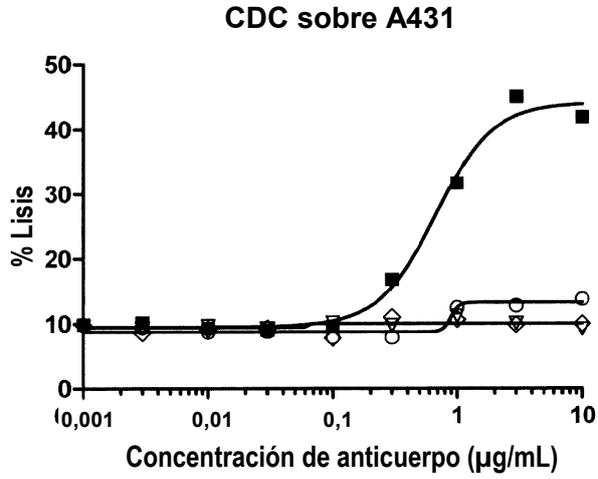


Figura 49

A



B

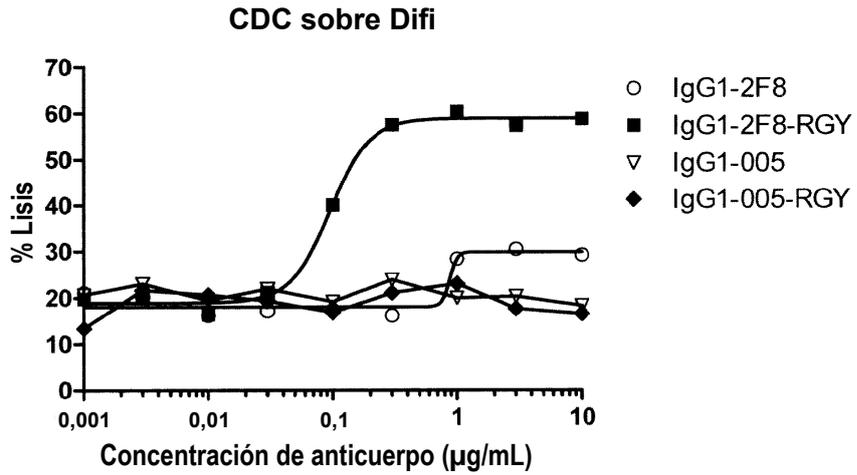


Figura 50

