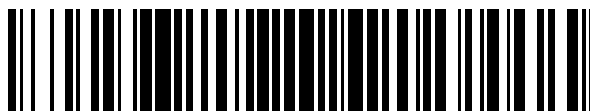


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 912**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2011 PCT/US2011/065174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2011 E 11851794 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2654780**

54 Título: **Mutantes FC de anticuerpo activo resistente a proteasa**

30 Prioridad:

**29.09.2011 US 201161540882 P**  
**23.12.2010 US 201061426619 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2017**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)**  
**800/850 Ridgeview Drive**  
**Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**STROHL, WILLIAM;**  
**JORDAN, ROBERT y**  
**BREZSKI, RANDALL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 623 912 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).

**Mutantes FC de anticuerpo activo resistente a proteasa****Descripción**5 **ANTECEDENTES****Campo de la invención**

10 **[0001]** La invención se refiere a regiones constantes de IgG de anticuerpos humanos, especialmente las regiones de Fc, mutadas para alterar sitios de escisión proteolítica que confieren resistencia a proteasas endógenas y derivados de patógenos y alteradas aún más para unir específicamente los receptores Fc $\alpha$  y activar respuestas mitogénicas por células inmunológicas por reticulación mediada por receptor de Fc o activación de la cascada del complemento. Las nuevas secuencias se pueden incorporar en composiciones de anticuerpo terapéutico en las que es deseable la resistencia proteolítica y la funcionalidad efectora citotóxica.

15 **Discusión del campo**

20 **[0002]** El isotipo IgG de anticuerpos humanos consta de subtipos IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, que contienen cada uno dos brazos de unión de antígenos (Fabs) conectados a un único dominio de Fc por la región de bisagra. IgG1, la subclase predominante representada en anticuerpos monoclonales terapéuticos, se consideran moléculas estables con semivida larga en circulación de 17,6 a 56,2 días (Salfeld, Nat Biotechnol 25 (12): 1369-72, 2007). Sin embargo, la IgG1 es susceptible a la proteólisis en la región de bisagra por una serie de proteasas fisiológicamente relevantes asociadas con cáncer invasivo (por ejemplo, metaloproteinasas de matriz) y microorganismos patológicos. La escisión por encima de los enlaces de disulfuro (de centro de bisagra) entre las cadenas pesadas, libera la Fab monovalente y la escisión bilateral por debajo de los enlaces de disulfuro libera una estructura bivalente, el fragmento de F(ab')<sub>2</sub>. Varias metaloproteinasas y dos enzimas bacterianas, endopeptidasa de glutamilo V8 de *Staphylococcus aureus* (GluV8) y la inmunoglobulina de la enzima degradante de *Streptococcus pyogenes* (IdeS), actúan sobre IgG1 en la bisagra inferior (por debajo de los enlaces de disulfuro (Fig. 1) y en última instancia, producir un F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento de Fc (Ryan et al., Mol Immunol 45 (7.): 1837-1846 2008).

30 **[0003]** Cuando la eficacia de los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs) dirigidos contra antígenos de la superficie celular está relacionada con la eliminación de la célula diana, el anticuerpo "funciones efectoras" impartidas por el dominio de Fc son demostrablemente involucradas y son importantes en el efecto terapéutico general del anticuerpo. (Bibeau et al., J Clin Oncol 27: 1122 - 1299, Cartron et al., Blood 99: 754 - 758, 2002 y Musolino et al., J Clin Oncol 26: 1789 - 1796 2008). Se cree que el dominio de Fc del anticuerpo que interactúa con los receptores de Fc gamma (Fc $\gamma$ R) expresados en células inmunes, así como las interacciones de dominio de Fc con complemento contribuyen a la acción de varios anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra la superficie celular de antígenos. Estas interacciones pueden conducir a la eliminación de la célula dirigida por mAb mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

40 **[0004]** El documento WO2006/071877 describe anticuerpos liberables por vía oral y anti-toxina.

45 **[0005]** Armor et al. (199 9) European Journal of Immunology 29 (8): 2613-2624 describe moléculas de IgG humana recombinante que carecen de unión de receptor I de Fc $\gamma$  y actividades desencadenantes de monocitos.

**[0006]** El documento US 2010/298542 describe una región constante de anticuerpo modificado.

50 **[0007]** Recientemente, se ha demostrado que una sola escisión proteolítica en uno de los polipéptidos de cadena pesada de una IgG1, no perturba la asociación de las cadenas y por lo tanto mantiene la longevidad en la capacidad de unión al antígeno de circulación; pero causa una pérdida de la capacidad de la IgG1 de unir Fc $\gamma$ Rs y conducir las funciones efectoras mediadas por Fc (Brezski et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106: 17.864-17.869 2009). Tanto las divisiones únicas como las múltiples de anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden conducir a especies que se unen a la diana pero han perdido alguna o toda la eficacia. Por tanto, plataformas Fc resistentes a proteasa de ingeniería, pero de función efectora mejorada podrían proporcionar una ventaja significativa para la mejora de la eficacia de terapéutica de enfermedad anti-cáncer y anti-infecciosa entre otros usos en los que se desea la destrucción de células o tejidos diana.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

60 **[0008]** La invención proporciona una molécula que contiene Fc modificada que es resistente a la degradación proteolítica en comparación con una molécula de IgG1 de tipo salvaje que contiene Fc, que comprende un dominio de Fc de anticuerpo con una región constante mutada de IgG1, donde la secuencia de E233-L234-L235-G236 de IgG1 humana se sustituye por P233-V234-A235 con G236 eliminado, como se define por numeración EU, y además comprende una o más sustituciones de la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje seleccionada de S239D/I332E; K326A/E333A; E333A/K334A; H268F/S324T/I332E; F243L/R292P/Y300L; S239D/H268F/S324T/I332E;

S267E/H268F/S324T/I332E; K326A/I332E/E333A; S239D/K326A/E333A; S267E/I332E; Y G237X/S239D/I332E donde X es A, D, P, Q OR S.

5 **[0009]** La invención también proporciona una molécula de unión aislada que es un polipéptido recombinante que comprende: (i) un dominio de unión capaz de unirse a una molécula diana en o unida a una célula, y (ii) una región de Fc de IgG1, en donde los residuos 214 a 238, definida por el sistema de numeración de la UE, comprenden una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 y 5, con G236 eliminado; caracterizada porque la molécula de unión es capaz de unirse a la molécula diana sobre una célula diana y produce una lisis medible dependiente del complemento o una destrucción mediada por células de la célula diana en presencia del tipo de células efectoras requerido.

**[0010]** La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de la invención.

15 **[0011]** La presente invención proporciona composiciones de dominios constantes de inmunoglobulina modificados útiles en la ingeniería de anticuerpos o terapéuticos de tipo anticuerpo. Las inmunoglobulinas de la clase IgG utilizadas como agentes terapéuticos, que comprenden una región de Fc y ligandos de superficie celular dirigidos, son candidatos particulares para la modificación usando las presentes composiciones. Las inmunoglobulinas modificadas de la invención son resistentes a las enzimas proteolíticas en el medio dirigido por el dominio de unión al antígeno de IgG, por ejemplo, el medio intratumoral que comprende una célula cancerosa o un antígeno asociado a la vasculatura tumoral, pero conservan importantes funciones efectoras asociadas con la región de Fc del anticuerpo.

25 **[0012]** De acuerdo con la invención, se proporciona un medio de generar anticuerpos monoclonales de IgG1 resistentes a proteasa mediante la incorporación de mutaciones en la región de Fc de IgG1 que confieren resistencia de proteasa. En un aspecto adicional, las actividades funcionales se pueden restaurar a IgG que contienen tales mutaciones mediante la introducción de cambios de aminoácidos adicionales en posiciones distales en la región de Fc.

30 **[0013]** La composición de la invención es un anticuerpo IgG1 resistente a proteasa que comprende los residuos de aminoácidos alterados en la bisagra inferior de IgG1, cuyos residuos tienen implicación en acoplamiento de Fc de FcγR así como habiéndose identificado como sitios de escisión proteolítica fisiológicamente relevante. En un aspecto, los residuos de la subclase de IgG1 humana se reemplazan con los residuos de bisagra inferiores correspondientes de IgG2 humana. En una realización, la secuencia de E233-L234-L235- G236 de la IgG1 humana se sustituye con IgG2 P233-V234-A235 con G236 eliminada (numeración EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 63: 78-85 1969)). En otra realización, los residuos de IgG1 E233-L234-L235-G236 se reemplazan con P233-V234-A235 con G236 suprimida y G237 se sustituye con un aminoácido seleccionado de A, D, P, Q o S. En todavía otra forma de realización, todos los residuos en el dominio constante de IgG1 que corresponde a los residuos 214 a 236, KVEPKSCDKT HTCPCPAPPEL LG (SEQ ID NO: 3), se sustituyen con una secuencia de la posición correspondiente en IgG2 humana o TVERKCCVEC PPCAPPVA (SEQ ID N° 4).

45 **[0014]** En un segundo aspecto, la capacidad del mutante de IgG1 resistente a la proteasa de la invención para acoplar FcγR y/o complemento se puede restaurar mediante la incorporación de mutaciones adicionales. Por lo tanto, sin tales sustituciones adicionales, el mutante de IgG1 resistente a proteasa que comprende una región de bisagra resistente a proteasa que comprende P233-V234-A235 con G236 eliminado, o el mutante en el que todas las secuencias de regiones constantes de IgG1 de los residuos 214-236 se reemplazan con las secuencias correspondientes de IgG2, (SEQ ID NO: 4), ha reducido la capacidad de activar FcγR para superar la pérdida de la función efectora relacionada con accionamiento FcR y C1q, mutaciones adicionales se incorporan en la región constante no de bisagra de manera que la molécula de IgG1 modificada conserva la capacidad mensurable o incluso mejorada para activar FcγR como se compara con la IgG1 humana de tipo salvaje. Por tanto, en una realización de la invención, la IgG1 resistente a la proteasa comprende aquellas moléculas que comprenden un dominio de Fc que tiene la secuencia de una IgG1 humana en las regiones de bisagra y de CH2, desde aproximadamente los residuos de UE 214 hasta aproximadamente el residuo 330, donde al menos residuos 233-237 están sustituidos con PVA/ (delección G236) y, adicionalmente, sustituciones específicas seleccionadas entre S239D/I332E; K326A/E333A; H268F/S324T/I332E; F243L/R292P/Y300L; S239D/H268F/S324T/I332E; S267E/H268F/S324T/I332E; E333A/K334A; G237A/S239D/I332E; y G237S/S239D/I332E; S298A/E333A/K334A; S239D/K326A/E333A y S267E/I332E. En una realización específica, la molécula de IgG derivada de las secuencias de dominio constante de IgG1 de tipo salvaje comprende SEQ ID NO: 6. En otra realización, la IgG resistente a proteasas se deriva de los dominios constantes de IgG2 de tipo salvaje con sustituciones a S239D e I332E. Por lo tanto, la inclusión de estas mutaciones adicionales autorizadas con funciones de Fc mientras que se mantiene la resistencia de la proteasa, y, en algunos casos, se mejora la función efectora mediada por Fc sobre IgG1 de tipo salvaje tanto en ensayos de unión FcγR in vitro en ensayos así como ensayos celulares in vitro tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Un anticuerpo monoclonal resistente a la proteasa con función efectora en la incorporación de un dominio de Fc de la presente invención es útil para terapéuticos anti-cáncer y anti-microbianos donde escisión de IgG debida a la presencia de proteasa local elevada en los sitios de crecimiento de tumor o infección.

**[0015]** En otro aspecto, las composiciones como se describe en el presente documento encuentran utilidad como componentes de moléculas terapéuticas administradas a sujetos mamíferos en necesidad del mismo. En un método de utilización de la composición, se modifica un anticuerpo que comprende secuencias de IgG1 humana de tipo salvaje y un dominio de unión a ligando usado en el tratamiento de sujetos que lo necesiten, para incorporar las secuencias de bisagra resistentes a proteasas P233-V234-A235 con G236 suprimida y, donde se desee, funciones de efector que restauran modificaciones seleccionadas de S239D/I332E; K326A/E333A; H268F/S324T/I332E; F243L/R292P/Y300L; K326A/I332E/E333A, S239D/K326A/E333A, y S267E/I332E S239D/H268F/S324T/I332E; S267E/H268F/S324T/I332E; E333A/K334A; G237A/S239D/I332E; y G237S/S239D/I332E. En una realización, la composición mutante IgG1 Fc se utiliza en una indicación en la que activación de Fc $\alpha$ Rs asociada con las funciones inmunes y efectoras, tales como i) citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), ii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), iii) anticuerpo dependiente de la fagocitosis celular (ADCP) iv) activación celular mediada por FcR (por ejemplo, liberación de citoquinas a través de reticulación de FcR), y v) activación/agotamiento de plaqueta mediado por FcR es esencial para la eficacia de la composición. En un aspecto, las mutaciones de Fc de IgG1 se incorporan en anticuerpos terapéuticos o fusiones de Fc de aglomerantes multivalentes que se dirigen a ligandos sobre células de trastornos proliferativos, tales como células tumorales; células vasculares tumorales; fibroblastos; células B o células T activadas, o células huésped patogénicas o no derivadas del huésped, especialmente células bacterianas.

**[0016]** En otra realización, el mutante Fc de IgG1 comprende una composición farmacéutica. En otra realización, el mutante Fc de IgG1 comprende una porción de una molécula farmacéuticamente activa. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas que comprenden el mutante Fc de IgG1 o las moléculas que comprenden mutantes Fc de IgG1 activas son útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por proliferación o migración indeseada o no controlada de células. En un aspecto, las composiciones de dominio constante resistentes a la proteasa de la invención, combinadas con un dominio de unión al ligando, se administran a un sujeto que lo necesita usando una vía de administración a un compartimento corporal en el que una o más proteasas capaces de degradar las moléculas de la subclase IgG1 se encuentran usando métodos de administración sistémica o métodos de administración local.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### **[0017]**

**Figura 1** es una representación de un anticuerpo humano de IgG1 acompañado por la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra, una región crítica para interacción con Fc $\alpha$ Rs y el complemento, y puntos de escisión de proteasa asignados.

**Figura 2** muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las porciones de las regiones constantes de tipo salvaje de IgG1 humana (SEQ ID NO: 1) y IgG2 (SEQ ID NO: 2) alineada con nuevos constructos 2h S239D/I332E (SEQ ID NO : 8) y 2h E333A/K334A (SEQ ID NO: 9) que muestran la numeración UE correspondiente para cada residuo; donde la región de bisagra tanto de IgG1 como de IgG2 comprenden los residuos de cisteína en los residuos de UE 226 y 229, al igual que las nuevas construcciones.

**Figuras 3A-B** muestran el análisis de digestión de anticuerpos que comprenden diferentes isotipos de IgG (A) y nuevas construcciones como se describe en la Fig. 2 (B) con la proteasa IdeS en diferentes puntos temporales.

**Figura 4A-D** muestra la digestión de construcciones de IgG con IdeS (A) GluV8 (B), MPM-3 (C), y MPM-12 (D) después de una incubación de 24 horas (n = 2).

**Figura 5A-G** muestran una unión de Fc $\gamma$ R que resulta del análisis de ALPHASCREEN $\text{®}$  para grupos de constructos de mAb resistentes a proteasa: Fc $\gamma$ RI (A), Fc $\gamma$ RIIIa (B y C), Fc $\gamma$ RIIb (D y E), y Fc $\gamma$ RIIIa (F y G) donde la reducción de % de señal máxima representa la capacidad de un constructo no marcado para competir con IgG1 biotinilada de unión (n = 2).

**Figura 6A-C** son gráficos de los ensayos de ADCP separados realizados con constructos de mAb resistente a la proteasa de tipo salvaje y IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>, donde el % de fagocitosis en el eje Y es relativo al número total de células en la muestra.

**Figura 7A-C** son gráficos de los ensayos de ADCC separados realizados con constructos de mAb resistente a la proteasa y IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> de tipo salvaje, donde el % de lisis en el eje Y es relativo a 100% de lisis del mismo número de células por detergente (n = 2).

**La Figura 8** es un gráfico de un ensayo de CDC realizado con constructos de mAb resistentes a la proteasa y IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> de tipo salvaje en el que el % de lisis en el eje Y es relativo a 100% de lisis del mismo número de células por el detergente (n = 2).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA LISTADO DE LA SECUENCIA

SEQ ID NO:	Descripción
1	IgG1 - Fc; Clase gamma Ig humana, subclase, bisagra, dominios CH2 y CH3
2	IgG2 - Fc; Clase gamma Ig humana, subclase 2 bisagra, dominios CH2 y CH3
3	Región de bisagra IgG1, UE 214-236
4	Región de bisagra IgG2 (2 hc), UE 214 - 235
5	Región de bisagra híbrida de IgG (2h), IgG2 UE 233 - 235
6	2hc (UE 214-447)
7	2h (UE 214-447)
8	2h S239D/I332E
9	2h E333A/K334A
10	2h F243L/R292P/Y300L

SEQ ID NO:	Descripción
11	2h H268F/S324T/I332E
12	2h S239D/H268F/S324T/I332E
13	2h S267E/H268F/S324T/I332E
14	2h K326A/E333A
15	2h G237X/S239D/I332E donde X es A, D, P, Q o S
16	2hc S239D/I332E
17	IgG2 S239D/I332E
18	2h K326A/I332E/E333A
19	2h S239D/K326A/E333A
20	2h S267E/I332E

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

### Abreviaturas

[0018] ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; ADCP, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos; CDC = citotoxicidad dependiente del complemento; FDCR = liberación de citoquinas dependientes de Fc; FcγR o FcγR = receptor gamma Fc; GluV8 = endopeptidasa de glutamilo V8 de *Staphylococcus aureus*; IdeS = Enzima degradante de inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* IgG = inmunoglobulina G; ITAM = motivo activador de tirosina de inmunorreceptor; ITIM = motivo inhibidor basado en tirosina de inmunorreceptor; Mab = anticuerpo monoclonal; MPM = metaloproteína de matriz; el término proteasa es equivalente a proteína y se usan indistintamente; PR = resistente a la proteasa.

### Definiciones y explicación de la terminología

[0019] "Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células aniquilantes naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva el antígeno y posteriormente matan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos específicos IgG de alta afinidad del ligando dirigidos a la superficie de las células diana estimulan la actividad citotóxica y las células son absolutamente necesarias para tal matanza. Lisis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo célula a célula, y no implica complemento.

[0020] La capacidad de cualquier anticuerpo concreto para mediar la lisis de la célula diana por ADCC puede ensayarse. Para evaluar la actividad de ADCC, se añade un anticuerpo de interés a las células diana que muestran el ligando diana en combinación con células efectoras inmunes, que pueden activarse por los complejos de anticuerpo de antígeno dando como resultado la citólisis de la célula diana. La citólisis se detecta generalmente mediante la liberación de marcadores (por ejemplo, sustratos radiactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células aniquilantes naturales (NK). Ejemplos específicos de ensayos ADCC in vitro se describen en Wisecarver et al., 1985, 19: 211; Bruggemann et al., 1987, J. Exp. Med. 166: 1351; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258: 183; Patel et al., 1995 J. Immunol Methods 184: 29. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC del anticuerpo de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., 1998, PNAS USA 95: 652. Cuando la célula efectora actúa principalmente a través de la fagocitosis, el proceso puede describirse como Fagocitosis Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCP).

**[0021]** "Citotoxicidad dirigida por complemento" o CDC se refiere a la forma de citotoxicidad en la que la cascada del complemento es activada por el componente del complemento C1q de unión al anticuerpo Fc.

**[0022]** El término "funciones efectoras" incluye aquellas interacciones de Fc con receptores gamma Fc (FcγR) expresadas en las células inmunes, así como las interacciones de dominio de Fc con el complemento que conducen a la eliminación de la célula que expresa el antígeno por procesos líticos o fagocitosis por células efectoras y componentes del complemento.

**[0023]** Los términos "Fc", "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc" como se usa en este documento se refieren a una proteína monomérica, dimérica o heterodimérica que tiene al menos un CH2 de inmunoglobulina y el dominio CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dimérica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

**[0024]** El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento es una forma específica de una proteína que contiene Fc que comprende al menos un dominio de unión a ligando que contiene, o conserva una homología sustancial con al menos uno de un dominio variable de anticuerpo de cadena pesada o ligera de al menos una especie de anticuerpo animal.

**[0025]** Secuencias constantes de subclase de IgG humana de tipo salvaje están catalogadas en la base de datos UniProt disponible en línea como P01857 (IgG1), P01859 (IgG2), P01860 (IgG3) y P01861 (IgG4). Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "región de Fc de IgG1 humana de tipo natural" se refiere a una región de Fc de IgG humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, que es del residuo K214 al residuo K447 de la cadena pesada de IgG humana, según la numeración de UE de Kabat. Los aminoácidos en la región constante están numerados por alineación con el anticuerpo IgG1 humano, EU (véase Cunningham et al., 1970 Biochemistry., 9: 3161 - 70). Es decir, las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo están alineadas con las cadenas pesadas y ligeras de la UE para maximizar la identidad de la secuencia de aminoácidos y cada aminoácido en el anticuerpo se asigna el mismo número que el aminoácido correspondiente en la UE. El sistema de numeración de la UE se usa convencionalmente en la técnica (véase generalmente Kabat et al., Sequences of Protein of Immunological Interest, Publicación NIH Nº 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. (1991)). De acuerdo con la convención, la alineación entre la región constante de IgG2 de tipo salvaje y la de EU da como resultado un aminoácido vacío en las posiciones 221-223 y 236 (Fig. 2, SEQ ID NO: 2).

**[0026]** Las secuencias de dominio constante de la cadena pesada de mamífero IgG se designan en secuencia como CH1-bisagra-CH2-CH3. La "bisagra", la "región de bisagra" o el "dominio de bisagra" de una IgG se define generalmente por incluir Glu216 y terminando en Pro230 de IgG1 humana de acuerdo con el sistema Kabat, pero funcionalmente, la parte flexible de la cadena puede considerarse para incluir residuos llamados regiones de bisagra superior e inferior, tales como de Glu216 a Gly237 (Roux et al., J. Immunol., 1998, 161: 4083) y la bisagra inferior se ha denominado residuos 233 a 239 de la región de Fc en la que la unión de FcγR fue generalmente atribuida. Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína formando enlaces S-S de cadena inter-pesada. Aunque los límites pueden variar ligeramente, según se numeran de acuerdo con el sistema Kabat, el dominio CH1 es adyacente al dominio VH y amino terminal a la región de bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina e incluye el primer dominio de región constante (más amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones de UE 118-215. El dominio de Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447; el dominio de CH2 es de aproximadamente Ala231 a Lys340 o Gly341 y el CH3 de aproximadamente Gly341 o Gln342 a Lys447. Los residuos de la región constante de la cadena pesada de IgG de la región CH1 terminan en Lys.

**[0027]** El término "resistente a proteasa" se refiere a la capacidad de una molécula compuesta de enlaces peptídicos, para resistir la escisión hidrolítica de uno o más de sus enlaces peptídicos en presencia de una enzima proteolítica. La resistencia a las enzimas proteolíticas es una propiedad relativa y se compara con una molécula que es menos capaz de resistir la escisión hidrolítica de uno o más de sus enlaces peptídicos durante un período de tiempo especificado y bajo condiciones especificadas, incluyendo el pH y/o temperatura en la que se examina la resistencia a la escisión. Un resultado de la escisión proteolítica indicativa de que se ha producido la escisión es la generación de fragmentos más pequeños (peso molecular inferior) en comparación con el peso molecular de la molécula madre intacta, no escindida.

**[0028]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico como se describe en el presente documento que comprende un dominio de Fc, que puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto.

#### Visión de conjunto

**[0029]** La presente invención fue motivada por un interés en la identificación de un dominio de Fc para su uso en la fabricación de anticuerpo terapéutico, fusiones Fc, y productos biofarmacéuticos similares con resistencia mejorada

a la proteólisis *in situ* y con capacidad retenida para causar la liberación de citoquinas o daños o destruyen el antígeno diana que muestra las células y los tejidos que rodean a las células diana.

**[0030]** Las proteasas se dividen en cinco grupos principales de acuerdo con la estructura del sitio catalítico y el aminoácido (como uno de los constituyentes) esencial para su actividad: proteinasas de serina, proteinasas de treonina, proteinasas de cisteína (tiol), proteinasas aspárticas, y metaloproteiniasas.

**[0031]** Varias proteasas extracelulares funcionan en todo el cuerpo y en compartimentos corporales que realizan procesos de regulación y metabólicos críticos. Las proteasas resistentes al ácido secretadas en el estómago (tales como la pepsina) y las proteasas de serina presentes en el duodeno (tripsina y quimotripsina) permiten la degradación de la proteína alimenticia dentro del tracto gastrointestinal; las proteasas presentes en la sangre o en el suero (trombina, plasmina, factor Hageman, etc.) juegan un papel importante en la coagulación sanguínea, así como la lisis de los coágulos y la regulación de las células del sistema inmune. Las proteasas están presentes o liberadas de los leucocitos (elastasa, catepsina G). Las proteasas determinan la vida útil de otras proteínas, desempeñando así un importante papel metabólico. A diferencia de las hormonas, interleucinas o quimiocinas, no se requiere señalización intracelular o alteración en la maquinaria de expresión de proteínas, haciendo del control proteolítico uno de los mecanismos de conmutación reguladores más rápidos. Además, la acción cooperativa de las proteasas como en las reacciones en cascada, da como resultado una amplificación rápida y eficiente de la respuesta de un organismo a una señal fisiológica.

**[0032]** Isotipos de IgG humana (las subclases de anticuerpos de clase G de globulina gamma madura; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentan capacidad diferencial para reclutar funciones inmunes. Por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es promovida por IgG1 e IgG3, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) es promovida por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es promovida por IgG1 e IgG3. Activación específica de isotipo de tales funciones inmunes se basa en la selectividad por los receptores de Fc en las células inmunes distintas y la capacidad de unirse a C1q activando de este modo el conjunto de un complejo de ataque a la membrana (MAC). Entre los diversos isotipos, afinidad relativa por los receptores de Fc $\gamma$ , que incluyen Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa/b/c, y Fc $\gamma$ RIIIa/b; es alto para IgG1 e IgG3. Sin embargo, afinidad de Fc $\gamma$  para IgG2 es considerablemente más baja con la excepción de polimorfismo Fc $\gamma$ RIIa H131 y IgG4 solamente tiene afinidad medible para Fc $\gamma$ RI. Mediante el uso de análisis de secuencia comparativa y estructuras co-cristales, los residuos de contacto clave para la unión al receptor se han mapeado en los residuos de aminoácidos que abarcan la bisagra inferior y la región CH2 ((Hezereh et al., J Virol. 75: 12161 - 12168 2001; Shields et al., J Biol Chem 276: 6591 - 6604 2001).

**[0033]** Muchos estudios anteriores concluyen que las sustituciones en los residuos de la bisagra inferior de IgG2 (posiciones EU 233-235) abroga función mediada por Fc $\gamma$ R y la activación del complemento. En un informe, la sustitución de E233P-L234V-L235A por G236 suprimida en la bisagra inferior de IgG1 era uno de un panel de constructos Fc de IgG1 humana que demostró haber perdido las funciones efectoras mediadas por Fc (Armor et al., 1999 Eur J Immunol 29: 2613 - 2624). Esta información sugiere que la sustitución de los residuos en o cerca de la bisagra de IgG1 con los residuos de IgG2 correspondientes resultó en una pérdida profunda de afinidad por la unión a Fc $\gamma$ Rs y la pérdida de la capacidad de afectar a la fijación del complemento y la muerte celular.

**[0034]** En segundo lugar, varias de las mismas posiciones de residuos están donde proteasas escinden la secuencia de IgG1 (Fig. 1) y que están ocupadas por diferentes aminoácidos en la secuencia IgG2 resistente más proteolítica como se muestra por la alineación de IgG1 y IgG2 humanas (Fig. 2). Los presentes inventores utilizaron esta información como punto de partida para diseñar una IgG-Fc resistente a la proteasa resistente pero con función efectora.

**[0035]** La presente invención es una demostración por primera vez de sustituciones en múltiples posiciones de las regiones constantes de IgG1 (Fc) que proporcionan inesperadamente un dominio de Fc (de acoplamiento de Fc $\gamma$ R) resistente a proteasa y funcional. Como se aprecia en la técnica, una vez que se conocen las propiedades de un dominio de Fc que tiene una secuencia específica de aminoácidos, la información puede aplicarse a la construcción o modificación de ingeniería de anticuerpos existentes o fusiones de polipéptido Fc. La resistencia de proteasa conferida por las composiciones de la invención incluye, por ejemplo, las proteasas que se escinden en los residuos de la región de bisagra de IgG1 que están sustituidas por aminoácidos alternativos derivados del residuo de IgG2 correspondiente, tales como MPM-3, MPM-7, MPM-12, HNE, la plasmina, la catepsina G, la pepsina, IdeS, o endopeptidasa de glutamilo I de *Staph aureus* (Fig. 1) (Ryan et al. 2008 *supra*).

**[0036]** Se seleccionaron los mutantes IgG1 multi-sustituidos en las bases de sus afinidades relativas para FcR humana (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa evaluados por ensayos de competición AlphaScreen®). Estos mutantes se ensayaron adicionalmente en los sistemas celulares apropiados para su capacidad para inducir ADCC por PBMCs y ADCP por macrófagos diferenciados *in vitro*. En los datos experimentales proporcionados en el presente documento, la IgG1 con las mutaciones introducidas especificadas (Tabla 2) eran mAbs resistentes a proteasas diseñados derivados de IgG1 con una mutación potenciadora de Fc.

**[0037]** Composiciones alternativas a residuos de región de bisagra IgG1 214 a 237 en el sistema de numeración de

la UE (SEQ ID NO: 3) se realizaron utilizando la IgG1 humana (SEQ ID NO: 1) de tipo salvaje (wt) que confiere la resistencia de proteasa incluyen el reemplazo de la secuencia de bisagra completa de IgG2 (SEQ ID NO: 4) o la bisagra quimérica (SEQ ID NO: 5) con sólo los residuos alterados 233 - 235 como se muestra en la Tabla 1.

5

Tabla 1.

	Designación Fc	Andamio IgG (UE 214-447)	CH2 de Bisagra/Proximal (EU 214-236)
	IgG1 wt (UniProt P01857, 96-329)	hIgG1	KVEPKSCDKTHTCPPCPPELLG (SEQ ID NO:3)
10	IgG2 wt (UniProt P01859, 97-326)	hIgG2	TVERKCCVECPAPPVA (SEQ ID NO:4)
	2 hc	hIgG1 con región de bisagra completa IgG2	SEQ ID NO:4
15	2h	hIgG1	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO:5)

**[0038]** Las mutaciones de compensación en regiones de mejora de la función efectora se pueden seleccionar de las sustituciones descritas anteriormente, como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

20

Tabla 2.

Mutaciones (posiciones numeradas UE)	Referencia
S239D/I332E	1
E333A/K334A	5
F243L/R292P/Y300L	3
H268F/S324T/I332E	4
S239D/H268F/S324T/I332E	4
S267E/H268F/S324T/I332E	4
K326A/E333A	2

Mutaciones (posiciones numeradas UE)	Referencia
K326A/I332E/E333A	1,2
S239D/K326A/E333A	1,2
S267E/I332E	1,4
G237X/S239D/I332E donde X es A, D, P, Q o S	1
S298A/E333A/K334A	5

25

30

35

**[0039]** El aumento de constructos de función Fc, previamente citados por:

40

1. Lazar, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 103: 4005 - 4010 (2006)
2. Idusogie, J Immunol 166: 2571 - 2575 (2001)
3. Stavenhagen, Cancer Res 67 (18): 8882 - 90 (2007)
4. Moore, et al. MAbs 2 (2): 181 - 189 (2010)
5. Shields et al., J Biol Chem 276: 6591 - 6604 (2001)

45

**[0040]** Mediante el uso de diversas medidas de función Fc en base a ensayos in vitro, varias secuencias de Fc resistente a la proteasa se identificaron, las cuales, cuando se incorporaron en una estructura completa de IgG (H2L2), proporcionan resistencia a una o más de las proteasas que actúan en los residuos de bisagra inferiores (EU232-237) mientras que tienen la capacidad de unirse a FcγR o promover la citotoxicidad. Los cambios en las actividades relacionadas con el Fc de los constructos seleccionados que comprenden un cambio en la bisagra, así como en la región CH2 y categorizados por la afinidad del receptor y de la bioactividad *in vitro* se muestran en la Tabla 3.

55

60

65

Tabla 3.

Isotipo / Constructo	Fc $\alpha$ RI	Fc $\alpha$ RIIa	Fc $\alpha$ RIIb	Fc $\alpha$ RIII	ADCC	ADCP	CDC
IgG1	++++ +	++++	++++	+++	+++++	+++++	++++ +
IgG2	-	++	- +/-		-	++	-
IgG1 2h (PVA)	-	-	- +/-		+	++	-
IgG1 2h E333A/K334A	-	+	- +/-		-	++	n.d.
IgG1 2h S239D/I332E	+++	+++++	++++	++++	+++++	+	-
IgG1 2h S239D/H268F/S324T/I332E	n.d.	++++	+++++	++++	+++++	+++++	-
IgG1 2h S267E/H268F/S324T/I332E	n.d.	+++++	+++++	+++	+/-	+	+++++
IgG1 2h K326A/E333A	n.d.	-	-	+/-	+/-	+++	+++++

## 20 Método de preparación de las moléculas que contienen Fc alteradas

[0041] Los sitios para la sustitución se eligieron basándose en el deseo de producir una composición que tiene las características estructurales de un anticuerpo nativo Fc, mantener la estabilidad, retener FcR vinculante y la capacidad de estimular la cascada del complemento, la lisis celular, fagocitosis celular o la liberación de citoquinas. Las proteínas, particularmente multímeros de cadena polipeptídica larga, con aminoácidos alterados o mutados se crean convenientemente mediante la modificación de un ácido nucleico dentro de un vector de expresión que codifica la secuencia parental con el fin de cambiar el codón genético correspondiente para el aminoácido deseado. El código genético y tales métodos son bien conocidos en la técnica. Cuando se crea una secuencia quimérica, como el Fc de la invención que comprende porciones de IgG1 y porciones de IgG2, segmentos más grandes de los respectivos ácidos nucleicos codificadores pueden empalmarse juntos o segmentos pueden reemplazarse por técnicas de clonación estándar.

### Prueba de proteólisis

[0042] Con el fin de determinar si una composición o un anticuerpo que contiene Fc es más resistente a proteolítica que otro, o de la composición de tipo salvaje, la tasa o grado en el que una enzima proteolítica degrada las diferentes composiciones o anticuerpos aislados que contienen Fc. Después de un período de tiempo, la degradación se mide para las diferentes composiciones utilizando un método capaz de determinar o bien la escisión de la cadena directamente, tales como la formación de una estructura de sitio de corte único, o una medición de los fragmentos recién formados. Alternativamente, cuando la escisión resulte en la pérdida de la actividad, un ensayo funcional se puede realizar, incluyendo un ensayo de unión.

[0043] La escisión proteolítica de una IgG1 puede ocurrir en cualquiera de las cuatro cadenas de polipéptidos de la estructura heterodimérica dimérica. La escisión de los resultados de IgG en la generación de fragmentos bien caracterizados, tales como Fab, (Fab)<sub>2</sub>, y fragmentos de Fc de pesos moleculares aproximados pero únicos. La separación de tales fragmentos generados durante un experimento de proteólisis se puede lograr usando una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), mediante electroforesis en gel, por análisis MALDI-TOF-MS (espectrometría de masas hora de vuelo ionización de láser/desorción asistida por matriz) después de la desglucosilación mediante PNGasa F (péptido N-glucosidasa F) como se describió previamente (WO2007024743A2, WO2009045894A1).

[0044] Por lo tanto, lo que se entiende por referencia a una composición que contiene Fc resistente a la escisión proteolítica es que es menos probable que se degrade la composición, que se pierda la actividad, que se pierda la afinidad para un socio de unión a Fc tal como una FcR tras la exposición a una enzima proteolítica que una molécula comparadora, tal como una IgG1 humana de tipo salvaje.

### Caracterización biológica de los mutantes

[0045] proteínas que contienen Fc pueden compararse para la funcionalidad por varios ensayos in vitro bien conocidos. En particular, la afinidad para los miembros de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y familia Fc $\gamma$ RIII de receptores Fc $\gamma$  es de interés. Estas mediciones se pueden hacer usando las formas solubles recombinantes de los receptores o las formas asociadas a células de los receptores. Además, la afinidad para FcRn, el receptor responsable de la vida media prolongada en circulación de las IgG, se puede medir, por ejemplo usando un formato de perla unida de ligando tal como "ALPHASCREEN" con FcRn soluble recombinante. AlphaScreen®, usado en el cribado de alto rendimiento, es una tecnología de ensayo homogéneo que permite la detección de eventos moleculares tales como la unión. Perlas "donantes" y "aceptores" recubiertas son la base de la tecnología de ensayo AlphaScreen®.

AlphaScreen®, un ensayo basado en perlas, funciona a través de la interacción de las perlas próximas una cerca de la otra, lo que resulta en una cascada de reacciones químicas que actúan para producir una señal en gran medida amplificada. Unión directa o indirecta, por ejemplo, competitiva, las mediciones se pueden aplicar para la evaluación de afinidades relativas y avidedces entre las proteínas.

**[0046]** Ha habido una evolución natural de los isotipos de IgG humana (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), exhibiendo cada una un espectro diferente de la capacidad para reclutar funciones inmunes, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por ejemplo IgG1 y IgG3), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por ejemplo, IgG1, IgG3). El acoplamiento específico de isotipo de estas funciones se basa en la selectividad diferencial para los receptores de Fc que residen en las células inmunes distintas y la capacidad de unirse a C1q y activar el montaje de un complejo de ataque a membrana (MAC) que resulta en CDC y CDP (complementar la fagocitosis dependiente) a través de receptores específicos de unión de componentes del complemento en los macrófagos efectores. La jerarquía de capacidad de unirse al componente inicial, C1q, de la cascada del complemento, de los isotipos humanos IgG1 es > IgG3 > IgG2 > IgG4 aunque la activación del complemento por IgG2 y IgG4 en la infección microbiana está bien documentada.

**[0047]** Los ensayos funcionales basados en células, tales como ensayos de ADCC y ensayos de CDC, proporciona una visión de las consecuencias funcionales probables de estructuras de construcción particular. Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es una reacción mediada por células en las que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células aniquilantes naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. En una realización, el ensayo de ADCC está configurado para tener las células NK como la célula efectora primaria, lo que refleja los efectos funcionales sobre la FcγRIIIa que es la única activación de receptor de tipo Fcγ que se sabe que se expresa por estas células.

**[0048]** Ensayos de fagocitosis también se pueden usar para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes mutantes, así como ensayos que pueden medir las respuestas celulares, tales como súper óxido o liberación de mediadores inflamatorios. En modelos *in vivo* se pueden utilizar, por ejemplo, en el caso de utilizar mutantes de anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de células T en ratones, una actividad que depende de los dominios de Fc que acoplan ligandos específicos, tales como receptores Fcγ. La activación dirigida por anticuerpos de macrófagos media la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), haciendo que las células diana opsonizadas se digieran por los macrófagos. Macrófagos *in vitro* diferenciados que expresan altos niveles de FcR pueden diferenciarse en el fenotipo M1 usando INFγ o GM-CSF para expresar niveles elevados de todos los FcR (FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIIa) en relación con los monocitos.

#### La producción de anticuerpos mutantes

**[0049]** Las composiciones de la invención son proteínas complejas que son producidas más convenientemente por las células huésped manipuladas. Como se describe aquí, la célula huésped elegida para la expresión del anticuerpo de proteína o monoclonal que contiene Fc recombinante es un contribuyente importante a la composición final, incluyendo, sin limitación, la variación en la composición de las fracciones de oligosacáridos que decoran la proteína en la inmunoglobulina de dominio de CH2. Por lo tanto, un aspecto de la divulgación implica la selección de células huésped apropiadas que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican los constructos que comprenden Fc de la descripción para el uso o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

**[0050]** Además, la célula huésped puede ser de origen mamífero o pueden seleccionarse de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, de levadura, de insecto o células vegetales, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.

**[0051]** Alternativamente, la célula huésped se puede seleccionar de una especie u organismo incapaz de polipéptidos de glicosilación, por ejemplo, una célula procarionta o un organismo, tal como y de *E. coli spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, células de planta o de insecto diseñadas.

**[0052]** La glicosilación en el sitio de glicosilación de origen natural dentro de la cadena pesada de IgG (N297, numeración EU) también contribuye a la afinidad de unión a Fc-para FcγR. A medida que las regiones constantes varían con isotipo, cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de carbohidratos N-ligadas, que afectan variablemente un conjunto de proteínas, la secreción o actividad funcional (Wright, A., y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15: 26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato N-ligado unido varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir residuos de oligosacáridos complejos de alta manosa, de ramas múltiples y biantenarios y ácido siálico (ácido neuramínico N-acetilo o NANA), fucosa, galactosa y GlcNAc (glucosamina N-acetilo) como azúcares terminales. El impacto en las funciones efectoras de la célula huésped y contenido de oligosacáridos de los anticuerpos se ha reconocido (Lifely, MR, et al., 1995 Glycobiology 5: 813-822; Jefferis, R., et al., 1998 Immunol Rev. 163: 59-76; Wright, A. y Morrison, SL, *supra*; Presta L. 2003. Curr Opin Struct Biol 13 (4): 519-25). Además, con respecto a una cadena de azúcar en un anticuerpo, se informa de que la adición o

modificación de fucosa en N-acetilglucosamina proximal en el extremo reductor de la cadena de azúcar N-glicósido de ligado de un anticuerpo cambia significativamente la actividad ADCC del anticuerpo (WO00/61739).

[0053] Además, las contribuciones relativas de galactosilación de los oligosacáridos biantenarios, la presencia de GlcNac entrecruzada, y fucosilación indican que Mabs no fucosilados muestran una mayor capacidad para mejorar ADCC como se mide *in vitro* e *in vivo* que otras modificaciones a las estructuras de oligosacáridos biantenarios N-ligados (Shields, et al. 2002. J Biol Chem 277: 26733-40; Niwa, et al. 2004. Cancer Res 64: 2127-2133).

[0054] Expresión o fabricación de un mAb resistente a la proteasa de la invención utilizando una célula huésped capaz de, que se diseña para (como por knockout o knockdown de enzimas específicas Shinkawa, et al. 2003 J. Biol. Chem., 278 : 3466-3473; EP1176195A1) o se induce, por ejemplo, por manipulación ambiental o nutricional, para producir un mAb que tiene bajo contenido de fucosa está dentro del alcance de la presente invención.

#### Anticuerpos, proteínas de Fc y fusión de Fc

[0055] Un dominio de unión a anticuerpo o fragmentos de los mismos pueden producirse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica y combinado con la información proporcionada en el presente documento puede incluir secuencias o derivarse de cualquier mamífero, tal como, pero no limitado a, un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, una cabra, o cualquier combinación de los mismos. Tales anticuerpos pueden proporcionar las estructuras básicas y los componentes de dominios de unión útiles en la producción de los constructos de anticuerpo de la presente invención. En un aspecto, los anticuerpos de dominios de unión se obtienen a partir de hibridomas preparados por inmunización de un ratón u otro animal con los péptidos diana, células o extractos de tejidos. Los anticuerpos pueden obtenerse usando cualquiera de las técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989) o por la selección de un anticuerpo que produce linfocitos y la clonación de la secuencias de ácido nucleico que codifican para los dominios de unión utilizando técnicas conocidas en la técnica.

[0056] La presente invención se dirige a la región constante de una IgG humana. Por lo tanto, cualquier anticuerpo o proteína de fusión que comprende un dominio de Fc humano en el que es deseable que la composición final muestre tanto resistencia proteolítica (como se describe en el presente documento) como la capacidad de unir FcγR y promover ADCC, ADCP, y/o CDC en un ensayo *in vitro* es abarcado por la presente invención. Un resto de direccionamiento incluyendo pero no limitado a un anticuerpo Fv o dominio variable único se puede fusionar con composición Fc según se desee. Una "Fv" consiste en un dímero de un dominio pesado y la región variable de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Desde el plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada una de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren especificidad de unión al anticuerpo antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo en una afinidad menor que el entero sitio de unión. "Fv de cadena única", también se abreviada como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una única cadena polipeptídica. El polipéptido scFv comprende generalmente un conector de polipéptido entre los dominios VH y VL. El resto de direccionamiento también puede seleccionarse de un paratopo de un anticuerpo (residuos no limitados a CDRs o estructuras de dominio variable de unión); una enzima; una hormona; un receptor; una citoquina; un antígeno de la superficie celular inmune; y una molécula de adhesión cuando la construcción es producida enteramente por métodos recombinantes. El resto de direccionamiento puede ser también de naturaleza no proteínica tal como un carbohidrato, un lípido, un lipopolisacárido, una molécula orgánica, o un complejo metálico o de metal. En general, cuando está presente, la molécula dirigida a diana se conectará a la Fc por un enlazador que puede ser un polipéptido o no polipéptido.

[0057] Las proteínas que comprenden Fc o fragmentos de Fc descritos en este documento se puede derivar de varias maneras bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos de dominios o proteínas de fusión Fc o componentes y dominios de unión de los mismos también se pueden obtener a partir de la selección de bibliotecas de tales dominios o componentes, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Una biblioteca de fagos puede ser creada mediante la inserción de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, tales como a partir de las células B de un animal o humano inmunizado (Smith, GP 1985. Science 228: 1315-1317). Bibliotecas de fagos de anticuerpos contienen pares de región de cadena variable pesada (H) y ligera (L) en un fago que permiten la expresión de fragmentos Fv de cadena única o fragmentos de Fab (Hoogenboom, et al. 2000, Immunol. Today 21 (8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede ser manipulada para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos adicionales deseables humanos monoclonales. Por ejemplo, los genes que codifican la molécula de inmunoglobulina de cadena pesada (H) y de cadena ligera (L) pueden mezclarse al azar (barajarse) para crear nuevos pares de HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Además, cualquiera o ambos de los H y L de la cadena de codificación de los genes pueden mutagenizarse en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente examinarse por capacidades de afinidad y neutralización deseables. Bibliotecas de anticuerpos o Fc también pueden crearse sintéticamente mediante la selección de una o más secuencias de marco humanas y la introducción de colecciones de casetes de CDR derivadas de repertorios de anticuerpos humanos o mediante la

variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13: 598- 602). Las posiciones de diversidad no se limitan a CDR, pero también pueden incluir los segmentos de marco de las regiones variables o pueden incluir regiones distintas de las variables de anticuerpos, tales como péptidos. En un aspecto, una biblioteca de fagos capaz de mostrar estructuras Fc diméricas ligadas a la proteína de recubrimiento de fago pIX como se describe en la solicitud co-pendiente (nº de serie de EE.UU. 61/261767) se puede utilizar para seleccionar nuevas estructuras que comprenden Fc de acuerdo con la presente invención.

**[0058]** Las bibliotecas de componentes de unión a diana, que pueden incluir componentes de unión a diana distintos de regiones variables de anticuerpos, pueden incluir bibliotecas de ribosomas de visualización, bibliotecas de presentación en levadura, y bibliotecas de presentación bacterianas. Presentación en ribosomas es un método de la traducción de ARNm en sus proteínas cognadas, manteniendo la proteína unida a ARN. La secuencia de codificación de ácido nucleico se recupera por RT-PCR (Mattheakis, LC et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 9022). La presentación de levadura se basa en la construcción de proteínas de fusión de receptor de adhesión de levadura de aglutinina-alfa asociada a la membrana, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo de apareamiento (Broder, et al. 1997 Nature Biotechnology, 15: 553-7). Presentación bacteriana se basa en la fusión de la diana a las proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o pared celular (Chen y Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79: 496-503).

**[0059]** En la presente memoria también se describen ácidos nucleicos que codifican las composiciones de la divulgación como polinucleótidos aislados o como porciones de los vectores de expresión que incluyen vectores compatibles con la expresión procarionota, eucariota o filamentosa de fago, secreción y/o visualización de las composiciones o mutágenos dirigidos de los mismos.

#### El uso de las moléculas que contienen Fc

**[0060]** Las composiciones (anticuerpos, fusiones Fc, fragmentos de Fc) generadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente pueden usarse para diagnosticar, tratar, detectar o modular la enfermedad humana o patologías específicas en las células, tejidos, órganos, fluido, o, en general, un huésped. Como se describe en el presente documento, la modificación de la porción de Fc de un anticuerpo, proteína de fusión de Fc, o un fragmento de Fc para reducir o realizar ablación en la degradación proteolítica al tiempo que conserva la unión de receptor Fc gamma medible o funciones efectoras especificadas pueden combinarse con un dominio de unión, tales como el paratopo de un anticuerpo o un dominio de unión a ligando, que conserva la especificidad de orientación original y la actividad biológica. Dominios de unión ejemplar son un paratopo de un anticuerpo, una o más CDR del anticuerpo, o uno o más dominios variables de anticuerpo; una enzima; una hormona; un receptor; un dominio extracelular de un receptor de membrana; una citoquina; un antígeno de la superficie celular inmune; y una molécula de adhesión. Los constructos resultantes proporcionan a los anticuerpos y constructos de Fc un espectro superior de actividades, propiedades biofísicas, estabilidad y capacidad de persistir en el cuerpo de un huésped.

**[0061]** El descubrimiento por los solicitantes de secuencias Fc con combinaciones únicas de resistencia a proteasas fisiológicamente relevantes y la capacidad o no capacidad para enganchar uno o más receptores Fc gamma y/o la capacidad de afectar a la lisis celular mediante la activación de las células efectoras o complemento prevén la capacidad de adaptar la molécula de unión para eficacia máxima en una indicación especificada. Por ejemplo, la capacidad de dirigirse a células huésped aberrantes tales como las implicadas en la neoplasia u otra proliferación no deseada como en la angiogénesis inapropiada, fibrosis inapropiada sería la más adecuada por una molécula que comprende Fc eucariota resistente a proteasa de la presente invención capaz de ADCC y ADCP. En contraste, las células bacterianas se destruyen fácilmente por mecanismos mediados por complemento. Por lo tanto, las infecciones bacterianas pueden ser tratadas por un constructo Fc adecuado de la invención que es resistente a proteasas bacterianas y tiene la capacidad de invocar CDC.

**[0062]** Los solicitantes han identificado métodos de selección de una Fc que tiene la combinación adecuada de propiedades y ejemplos de trabajo proporcionados de moléculas modificadas de propósito específicas que comprenden Fc. Las moléculas de eucariota resistente a proteasa y capaz de una o más de ADCC, ADCP, y CDC incluyen un dominio de Fc que tiene la secuencia de una IgG1 humana en que regiones de bisagra CH2 y, desde aproximadamente residuos UE 214 a aproximadamente el residuo 330 en que al menos los residuos 233-237 están sustituidos con PVA/(G236 eliminado) y que comprende además una o más sustituciones en el dominio de CH2 donde la molécula es capaz de una o más de ADCC, ADCP, y CDC incluyen los constructos **5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, y 17**. en una realización particular, dichas moléculas incluyen sustituciones seleccionadas entre I332E en combinación con otras sustituciones, tales como S239D/I332E (**5, 14**), S239D/H268F/I332E (no realizado), H268F/S324T/I332E (**8**), S239D/H268F/S324T/I332E (**9**), S267E/H268F/S324T/I332E (**10**), G237X/S239D/I332E donde X es A o S (**12**);, K326A/I332E/E333A (**15**), y S267E/I332E (**17**).

**[0063]** Las moléculas que son resistentes a una proteasa procarionota y capaz de CDC incluyen aquellas moléculas que comprenden un dominio de Fc que tiene la secuencia de una IgG1 humana en las regiones de bisagra CH2 y, desde aproximadamente los residuos UE 214 a aproximadamente el residuo 330 en que al menos los residuos 233 - 237 están sustituidos con PVA/(G236 eliminado) y que comprende además una o más sustituciones en el dominio de CH2 seleccionado de K326A/E333A (**11**), S267E/H268F/S324T/I332E (**10**), K326A/I332E/E333A (**15**),

S239D/K326A/E333A (16), y S267E/I332E (17).

**[0064]** Las moléculas que son resistentes a eucariotas de proteasa pero no promueven la lisis de células diana también pueden utilizarse ventajosamente para tratar una enfermedad o condiciones en las que la modulación de células diana y destrucción no diana de las células es el objetivo, tal como mediante el uso de un anticuerpo u otro constructo Fc como se describe en este documento que es resistente a la proteasa pero tiene ADCC, ADCP o CDC disminuidas en comparación con IgG1 de tipo silvestre. Moléculas que comprenden un dominio Fc de tipo no natural, no silvestre, que son resistentes a la proteasa incluyen aquellas moléculas que comprenden un dominio de Fc que tiene la secuencia de una IgG1 humana en las regiones de bisagra de CH2 y, desde aproximadamente los residuos UE 214 a aproximadamente el residuo 330, donde al menos los residuos 233-237 están sustituidos con PVA/ (G236 eliminado).

**[0065]** Por lo tanto, en base a las descripciones y ejemplos del presente documento, constructos que comprenden Fc habilitados actualmente que demuestran resistencia mejorada a una proteasa que ocurre en el sujeto mamífero y, opcionalmente, que tiene la capacidad de dirigirse a un antígeno en una célula proporciona moléculas mejoradas terapéuticas en relación con la molécula terapéutica que no es resistente a la proteasa.

### Administración

**[0066]** Al localizarse enzimas proteolíticas en función de su velocidad de formación o acumulación, por ejemplo pepsina en el tracto digestivo, o metaloproteinasas de la matriz (MPMs) en las regiones de la remodelación del tejido o tumor maligno, las composiciones de la invención son particularmente adecuadas para usos en los que se conoce un compartimiento de cuerpo para contener proteasas o contenido de proteasa anormalmente alto.

**[0067]** La invención proporciona formulaciones estables de una composición de IgG resistente a la proteasa, tales como un anticuerpo, que es preferiblemente una solución salina tamponada con fosfato o solución acuosa de sal mixta, así como soluciones y formulaciones conservadas, así como formulaciones conservadas de usos múltiples adecuados para uso farmacéutico o veterinario, que comprende al menos un anticuerpo resistente a la proteasa en una formulación farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y su formulación, inclusive de otras proteínas humanas, por ejemplo, albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams y Wilkins., Filadelfia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing pp. 691 a 1092, véase en especial pp. 958-989.

**[0068]** Una composición de IgG resistente a la proteasa con la función efectora en formulaciones estables o conservadas como se describe en este documento o se conoce en la técnica, puede administrarse a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una variedad de métodos de administración incluyendo la intravenosa (IV); intramuscular (IM); por vía subcutánea (SC); transdérmica; pulmonar; transmucosa; usando una formulación en un implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba; u otros medios apreciados por el experto en la materia, como bien se conoce en la técnica.

**[0069]** Para el lugar de administración específica a un compartimento o cavidad corporal, la administración puede ser intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o por medios transdérmicos.

**[0070]** Las enfermedades o patologías que pueden ser susceptibles de tratamiento usando una composición proporcionada por la invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades en las que la proliferación no deseada, la activación o migración de células es perjudicial tal como malignidad, hiper-activa o respuestas inmunes desequilibrada, la formación de tejido fibrótico, o infección a medida que las composiciones prevén la activación de mecanismos citotóxicos o citolíticos del sistema inmune del huésped a través de mecanismos conducidos por Fc $\alpha$ R. Tales enfermedades incluyen tumores malignos: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), células B, células T o FAB ALL, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplástico (MDS), una enfermedad linfoproliferativa, linfoma de células T cutáneo, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Castleman, glioma, glioblastoma, astrcitoma, linfoma maligno, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma de células renales, cáncer de mama, carcinoma ductal, lipoma, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de ovario, retinoblastoma, histiocitosis maligna, hipercalcemia de malignidad, plasmacitomas, condrosarcomas, sarcomas, cáncer de células Merkel, carcinoma hepatocelular, hepatoma, cáncer de células basales, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, sarcomas (tales como Ewings, de Kaposi, tejido blando infantil, adulto), melanomas, melanoma metastásico, hemangioma, enfermedad metastásica, osteosarcoma, rabdomiosarcoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer relacionado con resorción ósea, cáncer endometrial, cáncer vaginal, cáncer uterino, tumores de Wilms, cáncer relacionado con dolor óseo y similares.

**[0071]** Moléculas dirigidas capaces de antígenos en los linfocitos malignos de unión incluyen antígenos de células B tales como CD19, CD20, y CD22. Los tumores sólidos derivados de tejido epidérmico a menudo presentan y se estimulan por la unión del ligando a los receptores del factor de crecimiento epidérmico conocidos como la ErbB 1, ErbB2, ErbB3 y otro receptor capaz de señalizar o causar una respuesta proliferativa o una respuesta anti-apoptótica que conduce al crecimiento incontrolado del tumor. Otros antígenos comunes sobre los tumores sólidos son factor tisular o RON.

**[0072]** Las composiciones, cuando se combinan con un dominio de unión a la diana apropiada, también son útiles en el tratamiento de una enfermedad infecciosa causada por infección bacteriana (tales como Streptococcus, Staphylococcus y E. coli.), viral (tal como influenza, SIDA, RSV, SARS y el Virus del Nilo Occidental), fúngica (tales como aspergilosis, coccidioidomycosis, criptococosis, o candidiasis), o una infección protozoaria (tales como la tripanosomiasis, la toxoplasmosis, la giardia, o la malaria).

**[0073]** Las composiciones son útiles en el tratamiento de trastornos inmunológicos y autoinmunes generales, incluyendo pero no limitado a las enfermedades reumáticas, psoriasis, y esclerodermia.

**[0074]** Las composiciones son útiles en el tratamiento de trastornos asociados con la angiogénesis inapropiada. La angiogénesis es el proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos capilares, y es el resultado de la proliferación activa de las células endoteliales. La neovascularización está estrechamente regulada, y sólo se produce durante el desarrollo embrionario, la remodelación de tejidos, cicatrización de heridas y el ciclo periódico de desarrollo del cuerpo lúteo (Folkman y Cotran, Relation of vascular proliferation to tumor growth, Int. Rev. Exp. Pathol. 16, 207- 248 (1976)). Las células endoteliales normalmente proliferan mucho más lentamente que otros tipos de células en el cuerpo. Sin embargo, si la tasa de proliferación de estas células se convierte en no regulada, puede resultar la angiogénesis patológica. La angiogénesis patológica está implicada en muchas enfermedades. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares tales como angioma, angiofibroma, deformidad vascular, aterosclerosis, sinequia y esclerosis edémica; y enfermedades oftalmológicas, tales como la neovascularización después de la implantación córnea, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, diseasa angiogénica corneal, degeneración macular, pterigión, degeneración retiniana, fibroplasia retrolental, y conjuntivitis granular están relacionados con la angiogénesis. Las enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis; enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, telangiectasia, granuloma piógeno, dermatitis seborreica, úlceras venosas, el acné, la rosácea (acné rosáceo o eritematosa), verrugas, eczema, hemangiomas, linfangiogénesis también son dependientes de la angiogénesis.

**[0075]** La retinopatía diabética puede tomar una de dos formas, no proliferativa o proliferativa. La retinopatía proliferativa se caracteriza por la formación anormal de nuevos vasos (neovascularización), que crece en la superficie vítrea o se extiende en la cavidad vítrea. La degeneración macular, así mismo toma dos formas, secas y húmedas. En la degeneración macular exudativa (forma húmeda), que es mucho menos común, no hay formación de una red subretinal de la neovascularización coroidea a menudo asociada con la hemorragia intraretinal, líquido subretiniano, desprendimiento del epitelio pigmentario, y la hiperpigmentación. Glaucoma neovascular se produce en pacientes con diabetes o oclusión de la vena central de la retina o precipitados inflamatorios asociados con uveítis tirando del iris hacia el ángulo (Ch. 99. El Manual Merck 17a. Ed 1999).

**[0076]** La artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria, también resulta en la angiogénesis inapropiada. El crecimiento de las células endoteliales vasculares en la cavidad sinovial es activado por las citoquinas inflamatorias, y los resultados en la destrucción del cartílago y el reemplazo con pannus en la articulación (Koch AK, Polverini PJ y SJ Leibovich, Arth; 15 renio, 29, 471- 479 (1986); Stupack DG, Storgard CM y Cheresch DA, Braz J. Med Biol Res, 32, 578-581 (1999); Koch AK, Arthritis Rheum, 41, 951 962 (1998)).

**[0077]** Las composiciones son útiles en el tratamiento de la psoriasis, que es causada por la proliferación incontrolada de células de la piel. Células de crecimiento rápido requiere suficiente suministro de sangre, y se induce angiogénesis anormal en la psoriasis (Folkman J., J. Invest. Dermatol. 59, 40- 48 (1972)).

**[0078]** Un número de factores están involucrados en los procesos y eventos que conducen a la angiogénesis: moléculas de adhesión celular, integrinas, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), TNF-alfa, bFGF, y citoquinas, incluyendo IL-6 y IL-12. Por ejemplo, las integrinas estrechamente relacionadas pero distintas  $\alpha$ V $\beta$ 3 y  $\alpha$ V $\beta$ 5 han demostrado mediar vías independientes en el proceso angiogénico. Un anticuerpo generado contra angiogénesis inducida por factor básico de crecimiento de fibroblastos bloqueado por  $\alpha$ V $\beta$ 3 (bFGF), mientras que un anticuerpo específico a  $\alpha$ V $\beta$ 5 inhibió angiogénesis inducida por factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Eliceiri, et al., J. Clin Invest 103: 1227-1230 (1999); Friedlander et al., Science 270: 1500-1502 (1995)). Por lo tanto, la invención abarca el uso de dominios de unión de orientación dirigidos a estos objetivos en las composiciones de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades en las que está indicada la inhibición de la angiogénesis.

**[0079]** La solicitud de patente internacional en tramitación publicada por solicitantes WO2009023457A1 describe una estrategia para restaurar la función de efector a IgG escindidas utilizando anticuerpos monoclonales específicos de epítipo de sitio de escisión anti-bisagra. La incorporación de una Fc resistente a la proteasa y de función efectora

competente de acuerdo con la presente invención con dominios anti-bisagra para producir un anticuerpo bivalente produciría una mAb terapéutica capaz tanto de restaurar la función de Fc efectora a las IgG escindidas como de hacer el terapéutico resistente a silenciamiento por escisión proteolítica. En consecuencia, la presente invención abarca la incorporación de una región constante de Fc resistente a la proteasa de la invención con una región variable de mAb anti-bisagra según se describe.

**[0080]** Al haberse descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

#### EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN Y PRUEBA DE MUTANTES Fc

**[0081]** Una serie de constructos (que se muestra en la Figura 2 y la combinación de la región de bisagra de la Tabla 1 con mutaciones de restauración de actividad en la región CH2 seleccionada de la Tabla 2) se generaron utilizando tecnología recombinante estándar. La designación 2hc denota que el dominio constante de IgG1 que corresponde a la numeración de Kabat del anticuerpo UE (numeración de la UE) a partir de 214 a 236 (SEQ ID NO: 3) se han reemplazado con la secuencia de IgG2 correspondiente (SEQ ID NO: 4). La designación 2h indica que los residuos de IgG1 E233-L234-L235-G236 se sustituyen por los correspondientes residuos de IgG2 P233-V234-A235 con G235 eliminado.

Tabla 4.

Constructo	Designación/Constructo	Andamio de isotipo IgG	Secuencia UE 214-447	CD 142	CD20
1	IgG1 wt	hIgG1	SEQ ID NO: 1	X	X
2	IgG2 wt	hIgG2	SEQ ID NO: 2	X	X
3	2 hc (todos los residuos de bisagra de IgG2)	hIgG1	SEQ ID NO: 6	X	
4	2h	hIgG1	SEQ ID NO: 7	X	X
5	2h S239D/I332E	hIgG1	SEQ ID NO: 8	X	X
6	2h E333A/K334A	hIgG1	SEQ ID NO: 9	X	
7	2h F243L/R292P/Y300L	hIgG1	SEQ ID NO:	X	X
8	2h H268F/S324T/I332E	hIgG1	SEQ ID NO: 11	X	X
9	2h S239D/H268F/S324T/I332E	hIgG1	SEQ ID NO: 12	X	X
10	2h S267E/H268F/S324T/I332E	hIgG1	SEQ ID NO: 13	X	X
11	2h K326A/E333A	hIgG1	SEQ ID NO: 14	X	X
12	2h G237X/S239D/I332E donde X es A, D, P, Q o S	hIgG1	SEQ ID NO: 15	X	
13	2hc S239D/I332E	hIgG1	SEQ ID NO: 16	X	
14	IgG2 S239D/I332E	hIgG2	SEQ ID NO: 17	X	

**[0082]** Las regiones variables de un conjunto de constructos de anticuerpos se unen a CD142 (factor tisular) que permitió el ensayo de Fc dependiente de destrucción celular de los anticuerpos en ensayos celulares utilizando MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26<sup>TM</sup>) que expresan factor tisular (Brezski et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106: 17.864 a 17.869 2009). Un panel adicional se generó con regiones variables que se unen a CD20 que permitió el ensayo de actividad de CDC utilizando células WIL2-S que exhiben CD20 (ATCC, CRL-8885) (Brezski et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106: 17.864-17.869 2009). Todos los anticuerpos se expresaron transitoriamente en células 293T usando métodos y procedimientos de clonación estándar. MAb se purificaron usando columnas de proteína A a más de 95% de pureza antes del análisis experimental.

La digestión de proteasas de tipo salvaje y constructos de mAb

**[0083]** Digestiones de proteasa de IgG purificadas se llevaron a cabo a pH 7,5 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o, para las MPMs (MPM-3, MPM-7, MPM-12 y MPM-13 se obtuvieron de Enzo Life Sciences), en tampón de solución salina tamponada con Tris a 37°C. IdeS se obtuvo de Genovis, y GluV8 se obtuvo de Pierce. CaCl<sub>2</sub> se incluyó en las reacciones de MPM en 5 mM para todas las MPM probadas. Las concentraciones de anticuerpos fueron de 0,5 mg/ml y las reacciones se iniciaron por adición de enzima a una relación de aproximadamente 1-2% (en peso) a IgG a menos que se especifique lo contrario. Escisión de IgG se evaluó mediante el análisis de los electroforogramas después de la electroforesis microcapilar de Agilent Biosizing (Agilent Technologies). Todas las digestiones se realizaron por duplicado.

## Ensayos de unión de competición ALPHASCREEN®

**[0084]** Los estudios de unión de competición se llevaron a cabo en placas opacas de volumen de medio pocillo de 96 pocillos (Corning) en tampón de ensayo (PBS, 0,05% de BSA, 0,01% de Tween-20) a pH 7,4. Todos los estudios de competición se llevaron a cabo contra IgG1 biotinilada (1 IgG: 2 biotina, usando EZ Link™ NHS-LC-biotina, Pierce) a una concentración fija y compitiendo constructos de tipo salvaje y de proteasa resistente en diluciones de 3 veces en serie. Concentraciones FcγR eran 0,2 µg/ml en concentración final de los ensayos. IgG1 biotinilada (0,2 µg/ml final) y anticuerpos de tipo salvaje y resistentes a la proteasa (10 µl) se añadieron secuencialmente a cada fila de una placa de 96 pocillos por duplicado. FcγR designadas a continuación se añadieron tras la adición secuencial de 10 µl cada una de 1/50 diluido de perlas (Ni)-aceptador de quelato de níquel y perlas (SA)-donante de estreptavidina. La placa opaca se cubrió con un sello de aluminio para mantener las condiciones de luz de seguridad mientras se agitaba durante 30 minutos en un agitador orbital. A continuación, el sello se retiró y la fluorescencia se leyó en un lector de placas Envision™ (PerkinElmer) equipado con el conjunto de filtro apropiado de espectro de excitación/emisión AlphaScreen®. Los datos se transfirieron al software GraphPad PRISM™ y se normalizaron para máxima señal y curvas de competencia se representaron usando software de ajuste de curva de regresión no lineal.

## Resultados

**[0085]** De interés inicial era la determinación de la susceptibilidad de constructos de mAb a una serie de proteasas fisiológicamente relevantes anteriormente mostradas para escindir IgG1 en la región de bisagra inferior; MPM-3, MPM-7, MPM-12, MPM-13, GluV8 y IdeS. Constructos 1-5, 7, 9-11, 12 (G237A), 13-14 se ensayaron como anticuerpos que se unen a CD142. Las proteasas escindieron IgG1 en un grado variable de más de 24 horas. Mientras que MPM-3, MPM-12, IdeS eliminaron toda la IgG1 intacta (construcción 1) dentro de las 24 horas, MPM-7 escindió aproximadamente 30%, MPM-13 aproximadamente 40% y GluV8 aproximadamente 60%. El constructo 4 (2h) y los constructos con la modificación de bisagra inferior 2h eran resistentes a todos los MPMs a aproximadamente el mismo grado. El constructo 4 era resistente a GluV8 pero no IdeS. El constructo 2 también era más resistente a la digestión GluV8.

**[0086]** IdeS se ha demostrado escindir todos los isotipos de IgG humana (von Pawel-Rammigen et al., EMBO. 21: 1607-1615 2002). Los datos de un estudio del curso del tiempo (Figura 3A) indican que IdeS rápidamente convirtió IgG1 (1) y IgG2 (2) al fragmento F(ab')<sub>2</sub> (dentro de 5 minutos de incubación), mientras que la muestra 2h IgG1 (4) tenía un intermedio de escisión única a través de 120 minutos. De los constructos ensayados, 2H S239D/I332E (5) era el constructo proteolítico más resistente a IdeS (Figura 3B), con IgG intacta detectada incluso después de incubación de 24 horas (los otros constructos de anticuerpos no tenían IgG intacta detectable por 5 minutos). La mutación de S239D en (5), que está cerca del punto de escisión de IdeS entre G236 y G237, puede contribuir a la resistencia a la proteasa adicional en comparación con IgG1 2h (4).

**[0087]** Un panel de 12 constructos de anticuerpos anti-CD142 (1-5, 7, 9-13, y 14) se ensayó junto con sus homólogos IgG1 y IgG2 de tipo silvestre para la susceptibilidad a la proteólisis por IdeS, GluV8, MPM-3, y MPM-12. Los datos para IgG intactas restantes después de 24 horas de incubación se calcularon a partir de los electroforogramas y se muestran en la FIG. 4A-D.

**[0088]** Los datos demostraron que IgG1 en peso (1), IgG2 en peso (2), 2hc (3), IgG1 2h (4), 2hc S239D/I332E (13), IgG2 S239D/I332E (14), y 2h K326A/E333A (11) fueron susceptibles a la proteólisis por IdeS después de una incubación de 24 horas. En contraste, los constructos de 2h S239D/I332E (5), 2h G237A/S239D/I332E (12), F243L 2h/R292P/Y300L (7), 2 h S239D/H268F/S324T/I332E (9), y 2 h S267E/H268F/S324T/I332E (10) eran resistentes a la proteólisis por IdeS. Sorprendentemente, los constructos con más sustituciones región de bisagra IgG2 (que comprenden SEQ ID NO: 4) no eran resistentes a proteólisis de IdeS. El constructo de IgG2 S239D/I332E tenía menos de 40% de IgG intactas restantes después de 24 horas de digestión con IdeS.

**[0089]** La digestión con la proteasa GluV8 de *Staph aureus* indica que los constructos IgG2 S239D/I332E (14), 2h S239D/I332E (5), 2h G237A/S239D/I332E (12), y 2h F243L/R292P/Y300L (7) tenía un intervalo de 40-60% de IgG intactas que queda después de una digestión de 24 horas, similar al nivel de la escisión visto por peso IgG1 (1). Los constructos de IgG2 en peso (2), 2hc (3), 2hc S239D/I332E (14), IgG1 2h (4), IgG1 2h K326A/E333A (11), 2h S239D/H268F/S324T/I332E (9), y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10) mostró una mayor resistencia a la proteólisis por GluV8 (teniendo todos más del 75% de IgG intactas restantes) con relación a IgG1 en peso.

**[0090]** MPM-3 y MPM-12 representan dos tipos de proteasas asociadas con el cáncer. Se detectó menos del 5% de IgG1 en peso intacta después de la digestión con tanto MPM-3 como MPM-12. Por el contrario, la IgG2 en peso humana y todos los constructos ensayados mostraron un aumento de la resistencia a proteasa a tanto la MPM-3 como la MPM-12 como se demuestra por más del 60% de IgG intactas restantes después de 24 horas de digestión.

## Resultados de unión del receptor Fcγ

**[0091]** Se evaluó la capacidad de algunos de los constructos de Fc para competir para la unión a la familia Fcγ de receptores con IgG1 en peso. La capacidad de los constructos para reducir la señal máxima producida por la IgG1

biotinilada se muestran en la Fig. 5A-G. Los exámenes iniciales incluyen Constructos **1-2, 4-6**. Para el grupo inicial de constructos ensayados, IgG2 (**2**), IgG1 2h (**4**), y E333A 2h/K334A (**6**) no mostró unión detectable a la alta afinidad de FcγRI, mientras que una IgG1 de tipo silvestre mostró una unión robusta. El 2h S239D/I332E (**5**) mostró unión detectable pero reducida a FcγRI en comparación con IgG1. La IgG1 2h (**4**) y 2h E333A/K334A (**6**) no mostraron unión detectable a FcγRIIIa, mientras que el constructo de 2h S239D/I332E (**5**) mostró unión comparable a IgG1 en peso (Fig. 5B). Tres constructos: IgG2 (**2**), IgG1 2h (**4**), y E333A 2h/K334A (**6**) no mostraron unión detectable a FcγRIIb, mientras que IgG1 (**1**) y 2h S239D/I332E (**5**) mostraron unión comparable (Fig. 5D). IgG2 (**2**), IgG1 2h (**4**), y 2h E333A/K334A (**6**) mostró unión comparable, pero reducida a FcγRIIIa en comparación con IgG1. El constructo 2h S239D/I332E (**5**) muestra el nivel más alto de unión a FcγRIIIa, incluso superior a IgG1 en peso (Fig. 5F).

[**0092**] Además, el constructo 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**) mostró unión comparable a IgG1, mientras que el constructo 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**) había incrementado la unión a FcγRIIIa en comparación con IgG1 en peso (Figura 5C). Ambos de los constructos 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**) y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**) mostraron una mayor unión a FcγRIIb con relación a IgG1 en peso (Figura 5E). El constructo 2h K326A/E333A (**11**) mostró unión mínima detectable tanto a FcγRIIIa (Figura 5C) como a FcγRIIb (Figura 5E).

[**0093**] El constructo de 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**) mostró unión ligeramente disminuida a FcγRIIIa en comparación con IgG1 en peso, mientras que el constructo 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**) había aumentado la unión a FcγRIIIa (Figura 5G). El 2h K326A/E333A (**11**) mostró unión débil a FcγRIIIa en comparación con IgG1 en peso (Figura 5G).

#### Resumen

[**0094**] Estos resultados indicaron que los constructos resistentes proteolíticos que comprenden 2h S239D/I332E (**5**), 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**), y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**) eran capaces de unirse a FcγRIIIa, IIb, IIIa y en diversos grados, y los tres de estos constructos habían aumentado la unión con respecto a mutación 2h (**4**) sola. La mutación de residuos en la bisagra inferior de IgG1 en combinación con otras mutaciones CH2, que mejoró afinidad de unión de FcγRIIIa sobre IgG1 en peso como constructo 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**), mejoró la afinidad de 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**) y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (**10**) para FcγRIIb, mejoró la capacidad de unión de FcγRIIIa sobre IgG1 en peso como con los constructos de 2h S239D/I332E (**5**) y 2h S239D/H268F/S324T/I332E (**9**) eran resultados inesperados.

#### EJEMPLO 2. FAGOCITOSIS CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCP)

[**0095**] Con el fin de examinar la capacidad de los mAbs resistentes a la proteasa para mediar destrucción celular *in vitro* dependiente de Fc, se realizaron ensayos de ADCP. En este ensayo, las células fagocíticas se reclutan a la célula que presenta antígeno diana por la unión al anticuerpo y se mide la destrucción de la célula diana.

#### Procedimiento

[**0096**] PBMCs se aislaron de donantes humanos normales usando centrifugación en gradiente de Ficoll. Monocitos CD14pos se purificaron a partir de PBMCs por agotamiento negativo usando un kit de aislamiento de CD 14 que no agotan monocitos CD16pos (Stem Cell Technologies). Los monocitos se colocaron en placas a  $0,1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en medio X-VIVO-10 (Lonza) que contiene 10% de FBS y 20 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems) durante 7 días. 100 ng/ml de IFN $\gamma$  (R&D Systems) se añadió para las 24 horas finales de diferenciación. Las células diana para el ensayo de ADCP eran células MDA-MB-231 que expresan GFP. Macrófagos aislados se incubaron con expresión de GFP-MDA-MB-231 en una proporción de 4: 1 durante 4 horas con o sin constructos mAb de tipo salvaje y resistente a la proteasa en placas de 96 pocillos de fondo en U. Después de la incubación, las células se retiraron de las placas de 96 pocillos utilizando Acutasa (Sigma). Los macrófagos fueron identificados con anticuerpos de anti-CD11b y anti-CD14 (ambos de BD Biosciences) acoplados a AlexaFluor 647 (Invitrogen), y después las células se adquirieron en un FACS Calibur (BD Biosciences). Los datos fueron analizados mediante el FloJo Software (Tree Star). La fagocitosis de por ciento se determinó mediante la siguiente ecuación ((células GFPpos, CD11bpos, CD14pos)/(células GFPpos, CD11bpos, CD14pos más células GFPpos solas) x 100%.

[**0097**] Monocitos aislados se diferenciaron *in vitro* utilizando GM-CSF y IFN $\gamma$  como se ha descrito. como se muestra por otros, los macrófagos diferenciados expresaron todos los FcγRs (FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb, y FcγRIIIa) (datos no mostrados).

#### Resultados

[**0098**] Los datos representados en la Figura 6A indican que IgG1 en peso (**1**) y 2h S239D/I332E (**5**) lograron los más altos niveles de ADCP. La capacidad de ADCP de IgG2 en peso (**2**), IgG1 2h (**4**), y 2h E333A/K334A (**6**) produjeron capacidad baja, pero detectable de ADCP. Estos resultados indican que el constructo resistente a la proteasa 2h S239D/I332E (**5**) era capaz de células tumorales fagocitosis a un nivel comparable a IgG1 en peso. En un experimento separado, un panel adicional de constructos CH2 que contienen la región de bisagra 2h IgG1 se ensayaron para la capacidad de ADCP (Figura 6B). En este grupo, los constructos 2h S239D/I332E (**5**), 2h

F243L/R292P/Y300L (7), y 2h S239D/H268F/S324T/I332E (9) tenía ADCP similar a la IgG1 en peso (1), mientras que los constructos 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10), 2h H268F/S324T/I332E (8), y 2h G237A/S239D/I332E (12) había disminuido ligeramente fagocitosis máxima en relación con IgG1 en peso. Los constructos de 2h, K326A/E333A (11) tenía ADCP baja pero detectable, similar a IgG2 en peso (2) y IgG1 2h (4). Finalmente, los constructos que contienen la bisagra completa de IgG2 se ensayaron para ADCP. El constructo de IgG2 S239D/I332E (14) mostró ADCP similar a la IgG1 en peso, mientras que los constructos 2hc (3) y 2hc S239D/I332E (13) mostraron ADCP baja pero detectable.

### EJEMPLO 3. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC)

[0099] En este ensayo, las células mononucleares son reclutadas al antígeno diana mostrando la destrucción celular y se mide la célula diana.

#### Procedimiento

[0100] Se realizaron ensayos de ADCC como se ha descrito previamente (Scallon et al., Mol Immunol. 44: 1524-1534 2007). Brevemente, las PBMC se purificaron a partir de sangre humana por gradientes de Ficoll y se utilizaron como células efectoras para ensayos de ADCC. Células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) se utilizaron como células diana con una relación de células 1 diana a 50 células efectoras. Las células diana se pre-etiquetaron con BATDA (PerkinElmer) durante 20 minutos a 37°C, se lavaron dos veces y se resuspendieron en DMEM, FBS de 10% inactivada por calor, 2 mM de L-glutamina (todos de Invitrogen). Células diana ( $1 \times 10^4$  células) y efectoras ( $0,5 \times 10^6$  células) se combinaron y 100  $\mu$ l de células se añadieron a los pocillos de placas de 96 pocillos de fondo en U. 100  $\mu$ l adicional se añadió con o sin constructos de mAAb de tipo salvaje y resistentes a la proteasa. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos, se incubaron a 37°C durante 2 horas, y después se centrifugaron de nuevo a 200 g durante 3 minutos. Un total de 20  $\mu$ l de sobrenadante se eliminó por pocillo y la lisis celular se midió por la adición de 200  $\mu$ l del reactivo a base de europio DELPHIA (PerkinElmer). Se midió la fluorescencia utilizando un Envision 2101 Multilabel Reader (PerkinElmer). Los datos se normalizaron a la citotoxicidad máxima con 0,67% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) y control mínimo determinado por la liberación espontánea de BATDA de las células diana en ausencia de cualquier anticuerpo. Los datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta sigmoidal utilizando GraphPad Prism v5.

#### Resultados

[0101] Los datos se representaron gráficamente de manera que el nivel de lisis celular esté representado en el eje Y como una función de la concentración de anticuerpo. Los datos mostrados en la Figura 7A indican que el constructo 2h S239D/I332E (5) tenía el nivel más alto de capacidad de ADCC, que era aproximadamente una mejora de 8 veces (como se evidencia por el cambio en la CE50 aparente) sobre IgG1 en peso en el ensayo representado.

[0102] En otro experimento, se comparó la capacidad de ADCC de un panel extendido de constructos. La Figura 7B representa las curvas generadas por los datos. Tres constructos (2h S239D/I332E (5), 2h F243L/R292P/Y300L (7), y 2h S239D/H268F/S324T/I332E (9) tenía una mayor capacidad de ADCC con relación a IgG1 en peso. Los constructos 2h G237A/S239D/I332E (12) y 2h H268F/S324T/I332E (8) había aumentado ligeramente ADCC sobre IgG1 en peso, mientras que los constructos 2h K326A/E333A (11) y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10) tenían ADCC detectable, pero disminuida relativa a IgG1 en peso. La Figura 7C representa resultados de ADCC de un panel de constructos que contenía la región de bisagra completa de IgG2. El constructo de IgG2 S239D/I332E (14) tenía una CE50 menor de IgG1 en peso, pero también una lisis máxima más baja. Los constructos 2hc (3) y 2hc S239D/I332E (13) tenían ADCC detectable por encima de IgG2 en peso, pero inferior a IgG1 en peso. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la mutación de los residuos críticos en la bisagra inferior puede compensarse para restaurar unión ADCC y Fc $\gamma$ R por un número de mutaciones CH2. Sin embargo, no todas las mutaciones CH2 hechas a la columna 2h IgG1 (3) probada eran capaces de restaurar/mejorar ADCC con relación a IgG1 en peso.

[0103] Estos resultados fueron consistentes con el ensayo de unión Fc $\gamma$ R111a (Figura 5F-G) que muestra una mayor afinidad de 2h S239D/I332E (5) y 2h S239D/H268F/S324T/I332E (9), porque se cree que células NK que expresan Fc $\gamma$ R111a son la célula efectora relevante en ADCC.

### EJEMPLO 4. CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL COMPLEMENTO (CDC)

[0104] En este ensayo, componentes del complemento son reclutados a células que muestran antígeno diana y se mide la destrucción de células diana.

#### Procedimiento

[0105] Se llevaron a cabo ensayos de CDC como se ha descrito previamente (Brezski et al. J Immunol 181 (5): 3.183-3.192 2.008). Se utilizaron células WIL2-S como células diana para ensayos de CDC. 50  $\mu$ l de células se añadieron a los pocillos de placas de 96 pocillos para una concentración final de  $8 \times 10^4$  células por pocillo en RPMI,

5% de FBS inactivada por calor, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio inactivado por calor (todos de Invitrogen). 50 µl adicional se añadió a los pocillos con o sin anticuerpos y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. 50 µl de 10% de complemento de conejo (Invitrogen) se añadió a los pocillos y las placas se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos y 50 µl de sobrenadante se retiró a placas separadas y CDC se midió con el kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche). La absorbancia se mide usando un Spectra Max Plus 384 (PerkinElmer). Los datos se normalizaron a la citotoxicidad máxima con Triton X-100 (Sigma Aldrich) y el control mínimo que contenía sólo células y solo complemento. Los datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta sigmoidal utilizando GraphPad Prism v5.

## Resultados

[0106] Los datos mostrados en la Figura 8 indican que los constructos 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10) y 2h K326A/E333A (11) lograron niveles similares de lisis celular como IgG1 en peso. Los constructos IgG1 2h (4), 2h S239D/I332E (5), 2h F243L/R292P/Y300L (7), y 2h S239D/H268F/S324T/I332E (9) tenía una capacidad mínima CDC que era similar a la medida para IgG2 en peso (2).

## EJEMPLO 5: CONSTRUCTOS ADICIONALES RESISTENTES A LA PROTEASA

[0107] Sólo dos mutaciones CH2, en combinación con el E233P/L234V/L235A con G236 eliminado, eran capaces de actividad CDC comparable al peso IgG1, es decir, 2h K326A/K334A (11) y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10). Sin embargo, 2h K326A/K334A (11) tenía ADCC mínima y actividad ADCP, y 2h S267E/H268F/S324T/I332E (10) había reducido la actividad ADCC con relación a IgG1 en peso. Sería beneficioso diseñar constructos resistentes a las proteasas que tienen las tres actividades (ADCC, ADCP, y CDC). Las mutaciones H268F/S324T solas previamente no mostraron para aumentar la afinidad a FcγRs (Moore et al.), mientras que el constructo 2h H268F/S324T/I332E había aumentado ADCC con relación a 2h. Por lo tanto, la mutación I332E sola puede restaurar ADCC al constructo de bisagra resistente a proteasa 2h. Por lo tanto, los constructos serán generados que combinan tanto restauración ADCC/ADCP como restauración CDC a la bisagra parental 2h incluyendo 2h K326A/I332E/E333A (15) (SEQ ID NO: 18), S239D/K326A/E333A (SEQ ID NO: 19) (16), y S267E/I332E (17) (SEQ ID NO: 20).

[0108] Los tres constructos se ensayaron utilizando los materiales y métodos descritos en el Ejemplo 1. Los tres constructos mostraron resistencia a la MPM-3 y MPM-12 en comparación con IgG1 en peso.

[0109] Como se demostró anteriormente, IgG2 en peso (2) era resistente a GluV8, mientras que IgG1 en peso (1) tenía menos de 60% de IgG intacta izquierda después de una digestión de 24 horas. Los tres constructos habían aumentado la resistencia a la GluV8 en comparación con IgG1 en peso. Sin embargo, constructos de 2h K326A/I332E/E333A (15) y 2h S267E/I332E (17) habían disminuido la resistencia a GluV8 comparado con IgG2 en peso, mientras que 2h S239D/K326A/E333A (16) tenía resistencia comparable a IgG2 en peso. Estos datos sugieren que las mutaciones que introducen un Glu adicional en el CH2 en combinación con la mutación de bisagra inferior crea un sitio de escisión novedoso GluV8 (por ejemplo 2h S239D/I332E (5), 2h K326A/I332E/E333A (15) y 2h S267E/I332E (17)), mientras que mutaciones que no incorporan una Glu en la resistencia de visualización CH2 a GluV8 similar a IgG2 en peso (por Ejemplo 2h K326A/E333A (11) y 2h S239D/K326A/E333A (16)).

[0110] Tanto IgG1 en peso como IgG2 en peso fueron susceptibles a la proteólisis por IdeS. Los dos constructos de 2h K326A/I332E/E333A (15) y 2h S267E/I332E (17) tenía más de un 90% de IgG intactas que queda después de una incubación de 24 horas con IdeS, mientras que el constructo 2h S239D/K326A/E333A (16) tenía menos de un 20% de IgG intacta restante. Estos resultados sugieren que la adición de una Glu en el CH2 en combinación con la mutación de bisagra inferior aumenta la resistencia a proteasa a IdeS, una propiedad que la mutación de bisagra inferior sola, 2h (4), no imparte.

[0111] Los tres constructos se ensayaron para determinar su capacidad para realizar ADCP, ADCC y CDC. Los tres constructos habían aumentado la capacidad ADCP en comparación tanto con peso IgG2 como 2h (4), pero disminuyó ADCP máximo en comparación con IgG1 en peso. Dos de los constructos, 2h K326A/I332E/E333A (15) y 2h S239D/K326A/E333A (16) habían aumentado ligeramente ADCC con relación a IgG1 en peso. El constructo 2h S267E/I332E (17) había disminuido ADCC con relación a IgG1 en peso, pero el aumento de ADCC con relación a IgG2 en peso y 2h (4). Todos los tres constructos habían aumentado capacidad CDC relativa de IgG2 en peso y 2h (4); sin embargo, CDC para los tres ligeramente se redujo con relación a IgG1 en peso.

## EJEMPLO 6: RESUMEN DE MUTACIONES BENÉFICAS

[0112] Las siguientes once variantes de Fc se mostraron para proporcionar una composición de anticuerpo resistentes a una o más proteasas capaces de escindir IgG1 en la bisagra inferior mientras que proporciona una o más funciones efectoras exhibidas por la IgG1 humana de tipo silvestre. El símbolo 2h designa IgG1 con E233P/L234V/L235A - G236 eliminado.

Tabla 5.

Constructo	Abreviatura (#)
IgG1 2h S239D/I332E	2h DE (5)
IgG1 2h F243L/R292P/Y300L	2h LPL(7)
IgG1 2h H268F/S324T/I332E	2h FTE (8)
IgG1 2h S239D/H268F/S324T/I332E	2h DFTE (9)
IgG1 2h S267E/H268F/S324T/I332E	2h EFTE (10)
IgG1 2h K326A/E333A	2h AA (11)
IgG1 2h G237A/S239D/I332E	XDE 2h (12)
IgG2 S239D/I332E	IgG2 DE (14)
IgG1 2h K326A/I332E/E333A	2h AEA (15)
IgG1 2h S239D/K326A/E333A	2h DAA (16)
IgG1 2h S267E/I332E	2h EE (17)

[0113] Cuando se disponga de datos suficientes, los valores de CE50 calculados cuando una muerte celular estaba completa o casi completa para los ensayos *in vitro* utilizados como un proxy para varias funciones efectoras se muestra a continuación. Los datos mostrados en las Tablas 6A y 6B se generaron en condiciones idénticas, excepto que la fuente de PBMC de donantes era diferente. Por lo tanto, el cambio de pliegue del IgG1 en peso (1) en cada experimento se utiliza para normalizar la actividad biológica relativa.

Tabla 6A.

Constructo (#)	ADCC CE50 (ng/ml)	pliegue	ADCP CE50 (ng/ml)	pliegue	CDC CE50 (ng/ml)	pliegue
IgG1 en peso (1)	4,8	1	27	1	96	1
2h DE (5)	0,53	9	54	0,5	n/a	n/a
2h G237A/DE (13)	0,47	10	24	1,1	n,d,	n,d,
2h LPL (7)	0,31	15	30	0,9	n/a	n/a
2h AA (11)	21	0,2	n/a	n/a	157	0,6
2h DFTE (9)	0,70	7	34	0,8	n/a	n/a
2h EFTE (10)	n/a	n/a	44	0,6	77	1,2

Tabla 6B

Constructo (#)	ADCC CE50 (ng/ml)	pliegue	ADCP CE50 (ng/ml)	pliegue	CDC CE50 (ng/ml)	pliegue
IgG1 wt	0,42	1	186	1	114	1
2h AEA (15)	0,17	2,5	44*	4,2	202	0,56
2hDAA(16)	0,14	3,4	42*	4,4	308	0,37
2h EE (17)	5,6	0,08	52*	3,6	592	0,19
n/a = no aplicable (insuficientes datos de la curva de unión para determinar CE50), * lisis submáxima lograda n.d. = no hay datos pliegue = CE50 IgG1 en peso/constructo CE50						

[0114] El efecto sobre la ADCC y ADCP de una modificación adicional a G237 en la bisagra inferior, además de S239D/I332E y 233PVA/236, se examinó utilizando constructos enumerados en la Tabla 7 a continuación. El constructo G237A se ensayó y se determinó que tenía resistencia a MPMS, IdeS, y GluV8. Las otras constructos no se evaluaron en los ensayos de digestión. Estos datos indican que Ala (A) y Ser (S) se toleran en 237 pero no aumentan la actividad citolítica de la Fc anterior que se muestra por la molécula parental, 2h DE (5).

Tabla 7.

Constructo	ADCC	ADCP
IgG1 2h DE	++++++	+++++
IgG1 2h ADE	++++++	++++
IgG1 2h DDE	+	+
IgG1 2h PDE	++	+
IgG1 2h QDE	+	+
IgG1 2h SDE	+++++	++

[0115] Un resumen de la resistencia combinada relativa de la proteasa (PR) a las proteasas fisiológicamente relevantes específicas y los resultados *in vitro* para los ensayos de proxy que indican función efectora potencial (ADCC, ADCP, y CDC) se muestran en la Tabla 8 abajo, donde esas constructos con resistencia a la proteasa combinada y una o varias actividades efectoras más demostrables están en blanco.

Tabla 8.

Isotipo/ Constructo	PR MMPs	PR IdeS	PR GluV8	ADCC	ADCP	CDC
IgG1 wt (1)	-	-	+	+++++	+++++	+++++
IgG2 wt (2)	+++++	-	+++++	-	++	-
IgG1 2hc (3)	+++++	-	+++++	+	++	n.d.
IgG1 2hc DE (13)	+++++	-	+++++	+	++	n.d.
IgG1 2h (4)	+++++	-	+++++	+	++	-
IgG1 2h DE (5)	+++++	++++	++	+++++	+++++	-
IgG1 2h LPL (7)	+++++	++++	++	+++++	+++++	-
IgG1 2h FTE (8)	+++++	++++	+++++	+++++	+++	-
IgG1 2h DFTE (9)	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	-
IgG1 2h EFTE (10)	+++++	++++	++++	+	++++	+++++
2h AA (11)	+++++	-	+++++	+++	++	+++++
2h ADE (12)	+++++	++++	++	+++++	++++	n.d.
IgG2 DE (14)	+++++	+++	++	+++++	++++	n.d.
2h AEA (15)	++++	+++++	+++	+++++	+++	++++
2h DAA (16)	++++	+	+++++	+++++	+++	++++
2h EE (17)	++++	+++++	+++	+	+++	++++

**Resumen de los resultados**

[0116] El estudio de los constructos de Fc presentados en este documento demostró que la sustitución de los residuos de UE 233-236 con PVA/, los sitios donde se muestran las proteasas para escindir la molécula de IgG1, produjeron una Fc que era resistente a MPM-3, MPM-12, y GluV8; proteasas que escinden entre los residuos 232 y 234 (Fig. 1). Cuando se combinan con estas sustituciones, modificaciones adicionales producen resistencia a la IdeS de proteasa de Staphylococcus si las posiciones de residuos sustituidos incluyen una modificación en el sitio de escisión presunta (EU236-237) o en una posición más distal.

**[0117]** La sustitución de los residuos de UE 233-236 con PVA/ (2h, constructo 4) solo dio lugar a la pérdida de las funciones citolíticas medibles por los ensayos *in vitro* descritos por ADCC, ADCP, y CDC. Con respecto a la combinación de modificaciones IgG1 Fc que anteriormente había mejorado una o más funciones efectoras (Tabla 2) con la bisagra inferior PVA/sustitución, inesperadamente restauró uno o más aspectos de la actividad citolítica *in vitro*. Por lo tanto, ningún constructo era tanto resistente a la proteasa como tenía actividad medible o mejorada para las tres funciones efectoras, medidas por la muerte celular *in vitro* o ensayos de lisis celular para la ADCC, ADCP, y CDC.

1. Ocho constructos tenían resistencia a la proteasa y ADCC mejorada o comparable en comparación con IgG1 en peso: **5, 7, 8, 9, 12, 14, 15, y 16**. Seis de estos incorporan la sustitución I332E: incluyendo IgG1 2h DE (**5**), IgG1 2h FTE (**8**), IgG1 2h DFTE (**9**), IgG1 2h ADE (**12**), IgG2 DE (**14**) e IgG1 2h AEA (**15**).

2. Tres constructos de PR tenían ADCP similar en comparación con IgG1 en peso incluyendo IgG1 2h DE (**5**), IgG1 2h LPL (**7**), e IgG1 2h DFTE (**9**). Tres constructos tenían ADCP ligeramente reducida en comparación con IgG1 incluyendo IgG1 2h FTE (**8**), IgG1 2h EFTE (**10**), IgG1 2h ADE (**12**), e IgG2 DE (**14**).

3. Cinco mutaciones PR restauraron la capacidad de CDC, IgG1 2h AA (**11**), IgG 2h EFTE (**10**), 2h AEA (**15**), 2h DAA (**16**), y 2h EE (**17**). Además, los cinco tenían ADCP detectable, pero reducida en comparación con IgG1 en peso. Dos variantes, 2h AEA (**15**), 2h DAA (**16**), también tenían ADCC mejorada en comparación con IgG1 en peso (**1**).

Dos constructos (**8** y **9**) que comprenden mutaciones H268F/S324T no tenían CDC restaurada cuando una bisagra resistente a la proteasa estaba presente. La mutación S267E (EFTE (**10**)) restauró CDC pero disminuyó unión a FcγRIIIa (también observado por Moore et al. mAb 2010 2(2):181.) La mutación S267E aumentó la afinidad a FcγRIIb.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### **[0118]**

<110> Janssen Biotech, Inc.  
Brezski, Randall  
Jordan, Robert  
Strohl, William

<120> MUTANTES Fc DE ANTICUERPO ACTIVO RESISTENTE A PROTEASA

<130> CEN5304WOPCT

<140> TBD

<141> Adjunto

<150> 61/426619

<151> 2010-12-23

<150> 61/540882

<151> 2011-09-29

<160> 20

<170> Versión de patentIna 3,5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 623 912 T3

5 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 20 25 30  
 10 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 35 40 45  
 15 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 50 55 60  
 20 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 65 70 75 80  
 25 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 85 90 95  
 30 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 100 105 110  
 35 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 115 120 125  
 40 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 130 135 140  
 45 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 50 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 165 170 175  
 55 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 180 185 190  
 60 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 195 200 205  
 65 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 210 215 220  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 2  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5).. (5)  
 10 <223> Inicio de bisagra, residuos de UE 218  
  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (5).. (5)  
 15 <400> 2  
  
 20 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 1 5 10 15  
  
 25 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 20 25 30  
  
 30 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 35 40 45  
  
 35 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 50 55 60  
  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 40  
  
 45  
  
 50  
  
 55  
  
 60  
  
 65



ES 2 623 912 T3

<210> 4  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5  
<400> 4

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

**Pro Val Ala**

15  
<210> 5  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20  
<220>  
<223> secuencia humana de origen IgG

25  
<400> 5

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

30           **Pro Ala Pro Pro Val Ala**  
  20

35 <210> 6  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> secuencia quimérica de IgG humana

45  
<400> 6

50

55

60

65

ES 2 623 912 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

70 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 7  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 7

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 623 912 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

50 <210> 8  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 8

60

65



ES 2 623 912 T3

<210> 9  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 9

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

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

40

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

45

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

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

50

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

55

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

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

60

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

65

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

# ES 2 623 912 T3

<210> 10  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> IgG región constante variante de la secuencia humana

10

<400> 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 623 912 T3

1 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 5                                   5                                   10                                   15  
 5  
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Leu Pro Pro Lys  
 20                                   25                                   30  
 10  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 35                                   40                                   45  
 15  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 50                                   55                                   60  
 20  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Pro Glu Glu  
 65                                   70                                   75                                   80  
 25  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 85                                   90                                   95  
 30  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 100                                   105                                   110  
 35  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 115                                   120                                   125  
 40  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 130                                   135                                   140  
 45  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 145                                   150                                   155                                   160  
 50  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 165                                   170                                   175  
 55  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 180                                   185  
 60  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 195                                   200                                   205  
 65  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 210                                   215                                   220  
 70  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225                                   230

ES 2 623 912 T3

<210> 11  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 11

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

15  
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 20 25 30

20  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 35 40 45

25  
 Val Val Asp Val Ser Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 50 55 60

30  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 65 70 75 80

35  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 85 90 95

40  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn Lys  
 100 105 110

45  
 Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 115 120 125

50  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 130 135 140

55  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

60  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 165 170 175

65  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 180 185 190

70  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 195 200 205

75  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

# ES 2 623 912 T3

210 215 220

5 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

10 <210> 12  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 12

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 623 912 T3

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

10 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
20 25 30

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

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

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

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

35 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn Lys  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

75 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 13  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

10

<400> 13

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

60

65

ES 2 623 912 T3

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

25 <210> 14  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 14

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

40 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

ES 2 623 912 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

<210> 15  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

40 <220>  
<221> MUTÁGENO  
<222> (23).. (23)  
<223> X puede ser Ala, Asp, Pro, Gln o Ser

45 <400> 15

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

50 Pro Ala Pro Pro Val Ala Xaa Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
20 25 30

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

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

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

ES 2 623 912 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

50 <210> 16  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 16

60

65

ES 2 623 912 T3

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

10 Pro Val Ala Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 17  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 17

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 18  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 18

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

15  
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 20 25 30

20  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 35 40 45

25  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 50 55 60

30  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 65 70 75 80

35  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 85 90 95

40  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala  
 100 105 110

45  
 Ala Leu Pro Ala Pro Glu Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 115 120 125

50  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 130 135 140

55  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

60  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 165 170 175

65  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 180 185 190

70  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 195 200 205

75  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 210 215 220

80  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 19  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> humang IgG región constante variante de la secuencia

<400> 19

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

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

50

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

55

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

60

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

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

65

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 623 912 T3

<210> 20  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de secuencia de región constante de IgG humana

<400> 20

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 623 912 T3

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

5

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

10

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Una molécula modificada que contienen Fc que es resistente a la degradación proteolítica en comparación con una molécula de IgG1 de tipo salvaje que contiene Fc, que comprende un dominio de Fc de anticuerpo con una región constante de IgG1 mutado, en el que la secuencia de E233-L234-L235-G236 de la IgG1 humana se sustituye con P233-V234-A235 con G236 eliminado, como se define por la numeración de la UE, y comprende además una o más sustituciones de la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje seleccionada de S239D/1332E; K326A/E333A; E333A/K334A; H268F/S324T/1332E; F243L/R292P/Y300L; S239D/H268F/S324T/1332E; S267E/H268F/S324T/1332E; K326A/1332E/E333A; S239D/K326A/E333A; S267E/1332E; y G237X/S239D/1332E donde X es A, D, P, Q o S, tal como se define por la numeración de la UE.
- 10 2. La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que la molécula que contiene Fc comprende las sustituciones S239D/K326A/E333A de la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje, como se define por la numeración de la UE.
- 15 3. La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que la molécula que contiene Fc es:
- (i) resistente a la degradación por una proteasa capaz de escindir una molécula de IgG1 entre los residuos 222-237 como se define por la numeración de la UE, opcionalmente en la que la molécula que contiene Fc es resistente a la degradación por MPM-3, MPM-7, MPM-12, MPM-13, la cathepsina G, la pepsina, la enzima degradante de inmunoglobulina de *Strep. pyrogenes* (IDE), o endopeptidasa de glutamilo I de *Staph. aureus* (GluV8) en comparación con IgG1 de tipo salvaje, tal como en la que la molécula que contiene Fc es resistente a la degradación por una o más de MPM-3, MPM-7, IdeS, o GluV8 en comparación con la IgG1 de tipo salvaje;
- 20 (ii) capaz de promover ADCP medida en presencia de células mononucleares de sangre de CD14 pos y/o CD11b pos, en donde la molécula comprende la secuencia seleccionada del grupo SEQ ID NO: 8, 10-15, y 18-20, opcionalmente con la I332E adicional como se define por el sistema de numeración de la UE;
- 25 (iii) capaz de promover la ADCC medida en presencia de células mononucleares de sangre, opcionalmente en la que la molécula que contiene Fc comprende:
- (a) la sustitución adicional I332E como se define por el sistema de numeración de la UE; o
- 30 (b) la secuencia seleccionada del grupo SEQ ID NO: 8 y 10-12, y 15, 18-20;
- (iv) capaz de promover la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) medida por la lisis celular en presencia del complemento, opcionalmente en la que la molécula que contiene Fc comprende la secuencia seleccionada del grupo SEQ ID NO: 13, 14, y 18-20;
- 35 (v) capaz de unión a un receptor de Fcγ con una afinidad comparable o mayor que un dominio de Fc de IgG2 de tipo salvaje; o
- (vi) capaz de unión a un receptor de Fcγ con una afinidad comparable o mayor que un dominio de Fc de IgG1 de tipo salvaje.
- 40 4. La molécula que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la molécula que contiene Fc es un anticuerpo o proteína de fusión Fc, opcionalmente en la que el anticuerpo se une a un antígeno en una célula tumoral, la matriz tumoral, o la vasculatura del tumor, por ejemplo en la que el anticuerpo se une a una de CD20, ErbB1, ErbB2, ErbB3, VEGF, RON, y factor tisular.
- 45 5. La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia del dominio de Fc tiene una identidad de al menos el 90% con IgG1 humana de tipo salvaje desde el residuo 214 a aproximadamente el residuo 340 en el sistema de numeración de la UE.
- 50 6. Una molécula aislada de unión que es un polipéptido recombinante que comprende: (i) un dominio de unión capaz de unirse a una molécula diana en o unido a una célula, y (ii) una región de Fc de IgG1, en donde los residuos 214 a 238, definidos por el sistema de numeración de la UE, comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 4 y 5, con G236 eliminado; **caracterizado porque** la molécula de unión es capaz de unirse la molécula diana en una célula diana y la molécula produce la lisis dependiente del complemento medible, o destrucción de célula mediada de la célula diana en presencia del tipo de célula efectora requerida.
- 55 7. La molécula de unión de la reivindicación 6 en la que:
- (i) el dominio de Fc comprende además una o más sustituciones de la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje seleccionada de S239D/I332E; K326A/E333A; E333A/K334A; H268F/S324T/I332E; F243L/R292P/Y300L; S239D/H268F/S324T/I332E; S267E/H268F/S324T/I332E; K326A/I332E/E333A; S239D/K326A/E333A; S267E/I332E, y G237X/S239D/I332E donde X es A, D, P, Q o S, tal como se define por la numeración de la UE;
- 60 (ii) el dominio de Fc es resistente a la degradación por una proteasa capaz de escindir una molécula de IgG1 entre los residuos 222-237, definido por el sistema de numeración de la UE, opcionalmente donde la molécula que contiene Fc es resistente a la degradación por MPM-3, MPM- 7, MPM-12, MPM-13, la cathepsina G, la pepsina, IdeS, o GluV8 en comparación con IgG1 de tipo salvaje; o
- 65

(iii) el dominio de unión se selecciona de un dominio que contiene el paratopo de un anticuerpo; una enzima; una hormona; un receptor; una citoquina; un antígeno de la superficie celular inmune; y una molécula de adhesión.

5 **8.** La molécula de unión de la reivindicación 7 (iii), en la que la molécula comprende dos o más dominios de unión a diana y exhibe avidéz.

**9.** La molécula de unión de la reivindicación 8, en la que el dominio de unión comprende un paratopo de un anticuerpo que se une a un antígeno en una vasculatura célula tumoral o tumor.

10 **10.** La molécula de unión de la reivindicación 9, en la que la molécula de unión se une a una de CD20, ErbB1, ErbB2, ErbB3, VEGF, RON y factor tisular.

**11.** Un compuesto farmacéutico que comprende la molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

15 **12.** El compuesto farmacéutico de la reivindicación 11 para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la proliferación no deseada o migración de células, donde la enfermedad es una enfermedad maligna, enfermedad fibrótica o una enfermedad caracterizada por la angiogénesis no deseada.

20 **14.** La

**15.** La molécula de unión de la reivindicación 6 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad caracterizada como una infección de un organismo procariótico.

25 **16.** La molécula de unión de la reivindicación 14, en la que la Fc es resistente a una proteasa procariótica y es capaz de CDC.

**17.** La molécula de unión para su uso según la reivindicación 14, en la que la molécula de unión comprende una secuencia seleccionada del grupo SEQ ID NO: 13, 14, y 18-20.

30 **18.** La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, el compuesto farmacéutico de la reivindicación 11, el compuesto farmacéutico para su uso según la reivindicación 12, la molécula de unión para su uso según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en la que la molécula que contiene Fc o la molécula de unión comprende las sustituciones S239D/K326A/E333A, como se define por la numeración de la UE, de la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje.

35

40

45

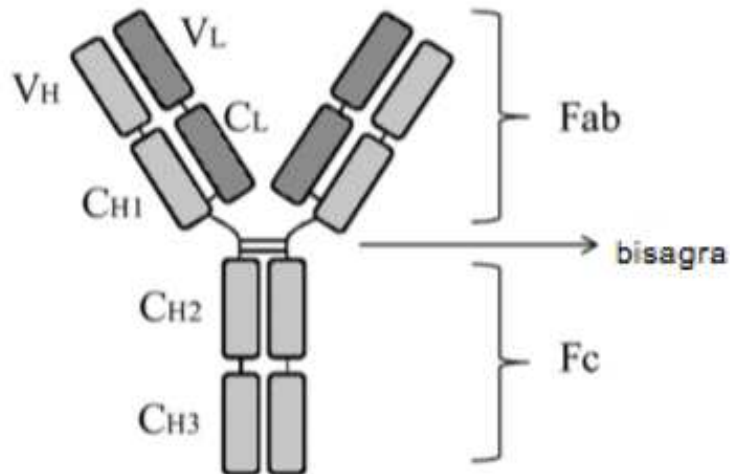
50

55

60

65

*Fig. 1*



Bisagra superior  
(Región Fab)

Bisagra  
de núcleo

Bisagra inferior/Región CH2  
(Región F(ab')<sub>2</sub>)

S(219)-C-D-K<sub>1</sub>T<sub>2</sub>H<sub>3</sub>T-C-P-P-C-P-A-P<sub>4</sub>E<sub>5</sub>L<sub>6</sub>L-G<sub>7</sub>G-P-S(239)

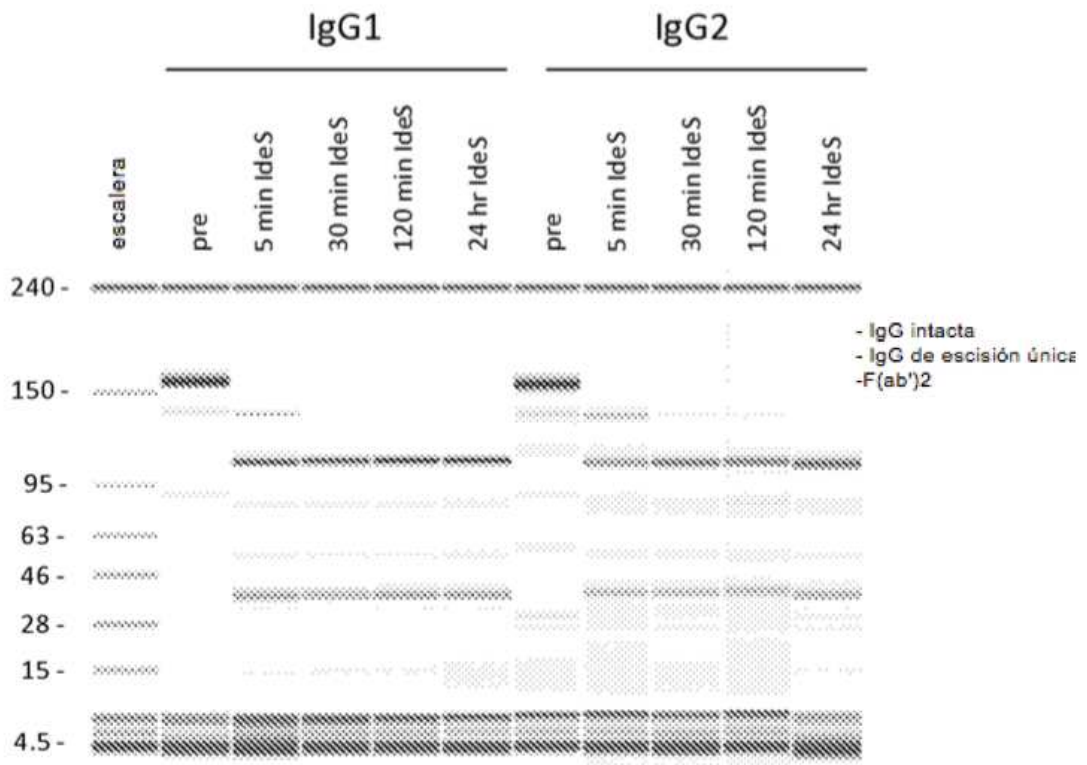
- 1 Plasmina
- 2 Elastasa de neutrófilo humano (ENH)
- 3 Papaína
- 4 MMP-3, MMP-12
- 5 Endopeptidasa de glutamilo I (GluV8), Catepsina G
- 6 Pepsina, MMP-7
- 7 IdeS

**Fig. 2**

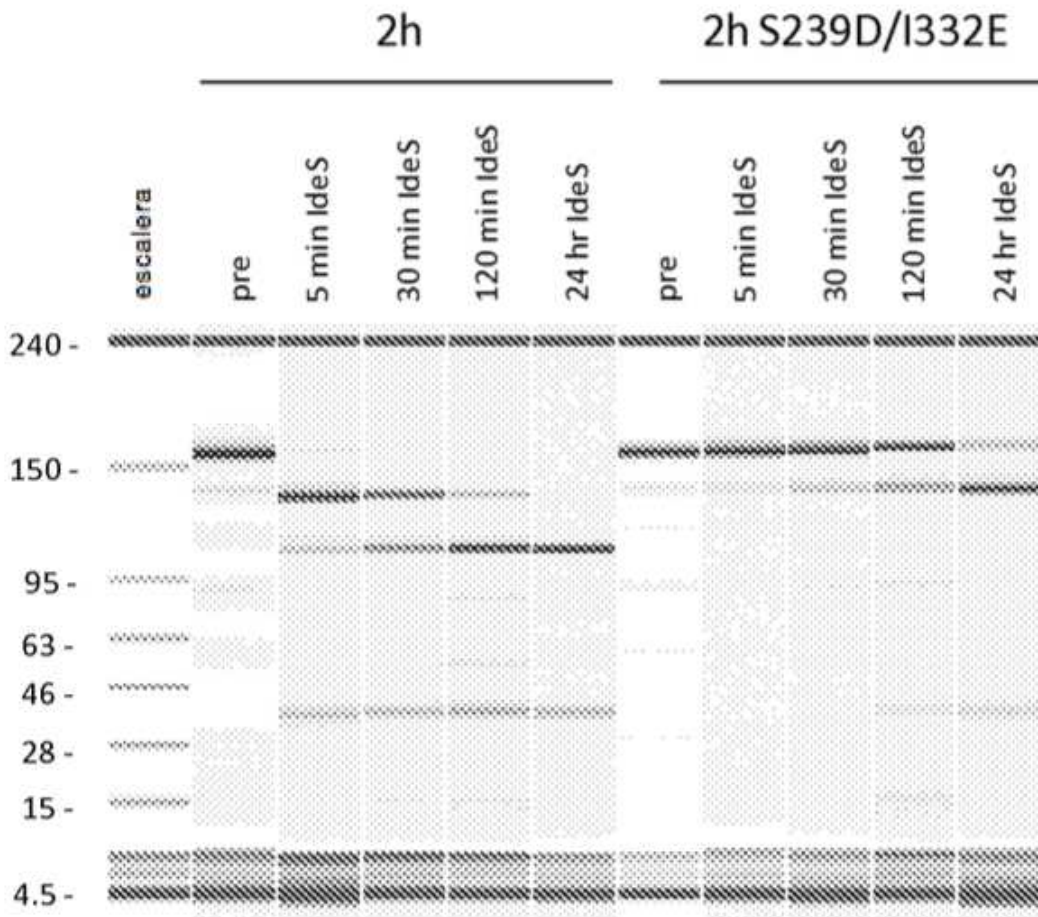
hIgG1	tipo silvestre	EU 214	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV	263	SEQ ID
NO: 1					
hIgG2	tipo silvestre		T--R-C-VE///-----PVA/-----		SEQ ID
NO: 2					
hIgG1	2hDE		-----PVA/--D-----		SEQ ID
NO: 8					
hIgG1	2hAA		-----PVA/-----		SEQ ID
NO: 9					
hIgG1	tipo silvestre	264	VDVSHEDPEVKFIHWYVDGVEVHHAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW	313	
hIgG2	tipo silvestre		-----Q-----F--F-----V-----		
hIgG1	2hDE		-----		
hIgG1	2hAA		-----		
hIgG1	tipo silvestre	314	LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV	363	
hIgG2	tipo silvestre		-----G-----T-----E-M-----		
hIgG1	2hDE		-----E-----		
hIgG1	2hAA		-----AA-----		
hIgG1	tipo silvestre	364	SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPEINRYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD	413	
hIgG2	tipo silvestre		-----S-----M-----		
hIgG1	2hDE		-----A-----		
hIgG1	2hAA		-----A-----		
hIgG1	tipo silvestre	414	KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	447	
hIgG2	tipo silvestre		-----		
hIgG1	2hDE		-----		
hIgG1	2hAA		-----		

- Denota que las secuencias son iguales  
/ Denota una eliminación

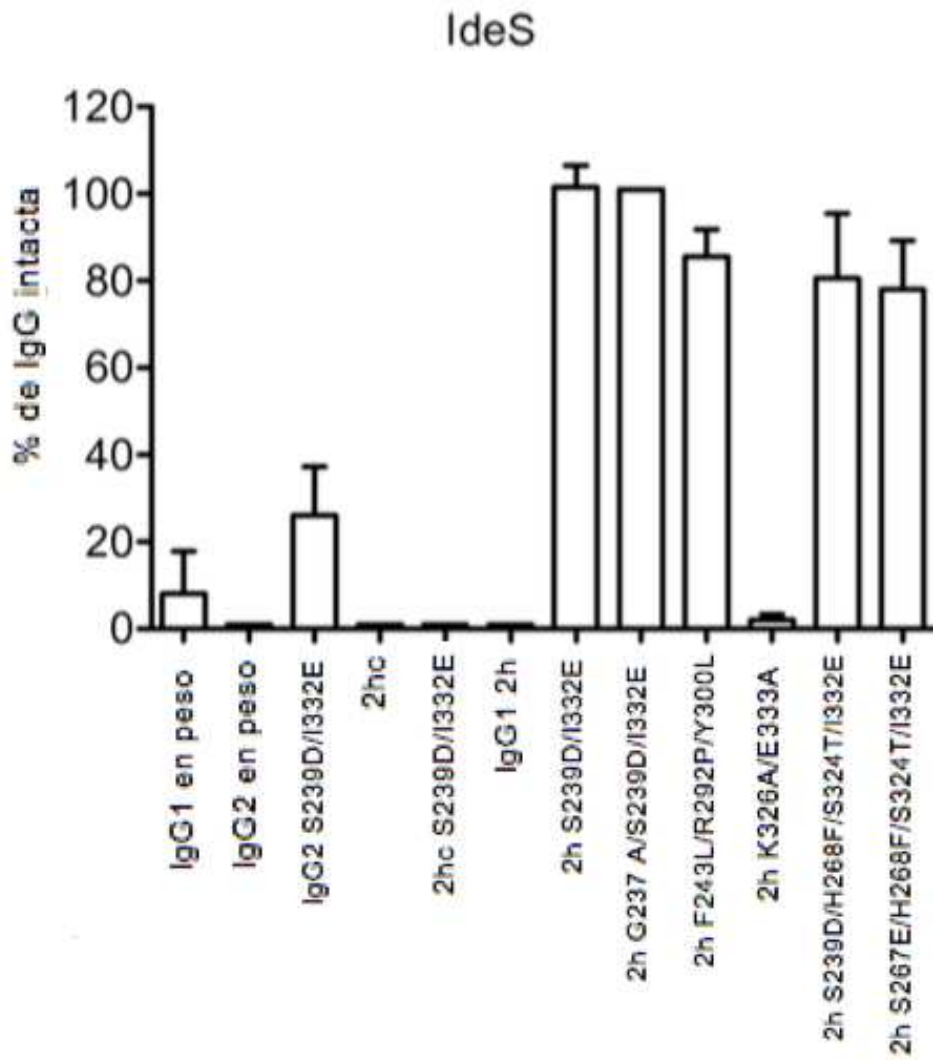
**Fig. 3A**



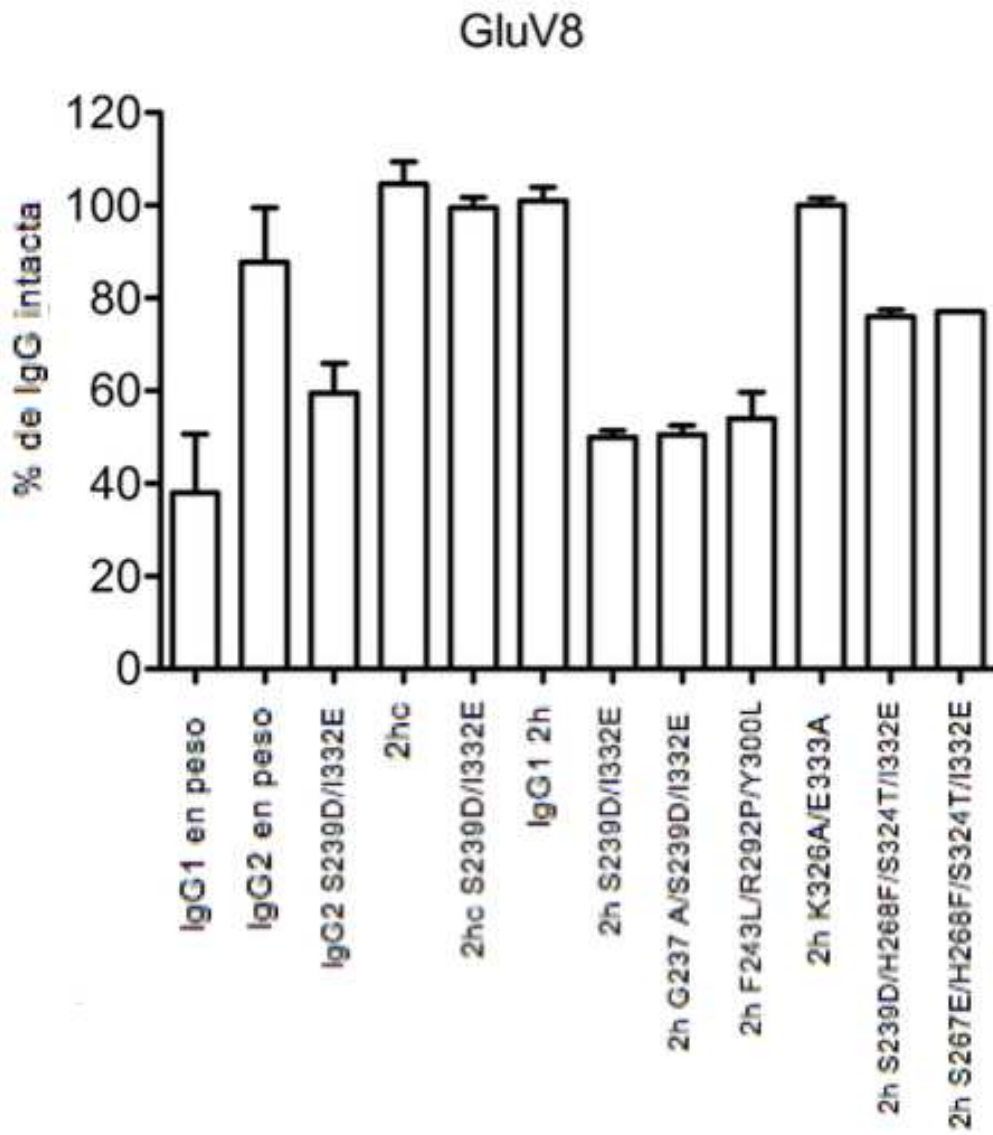
**Fig. 3B**



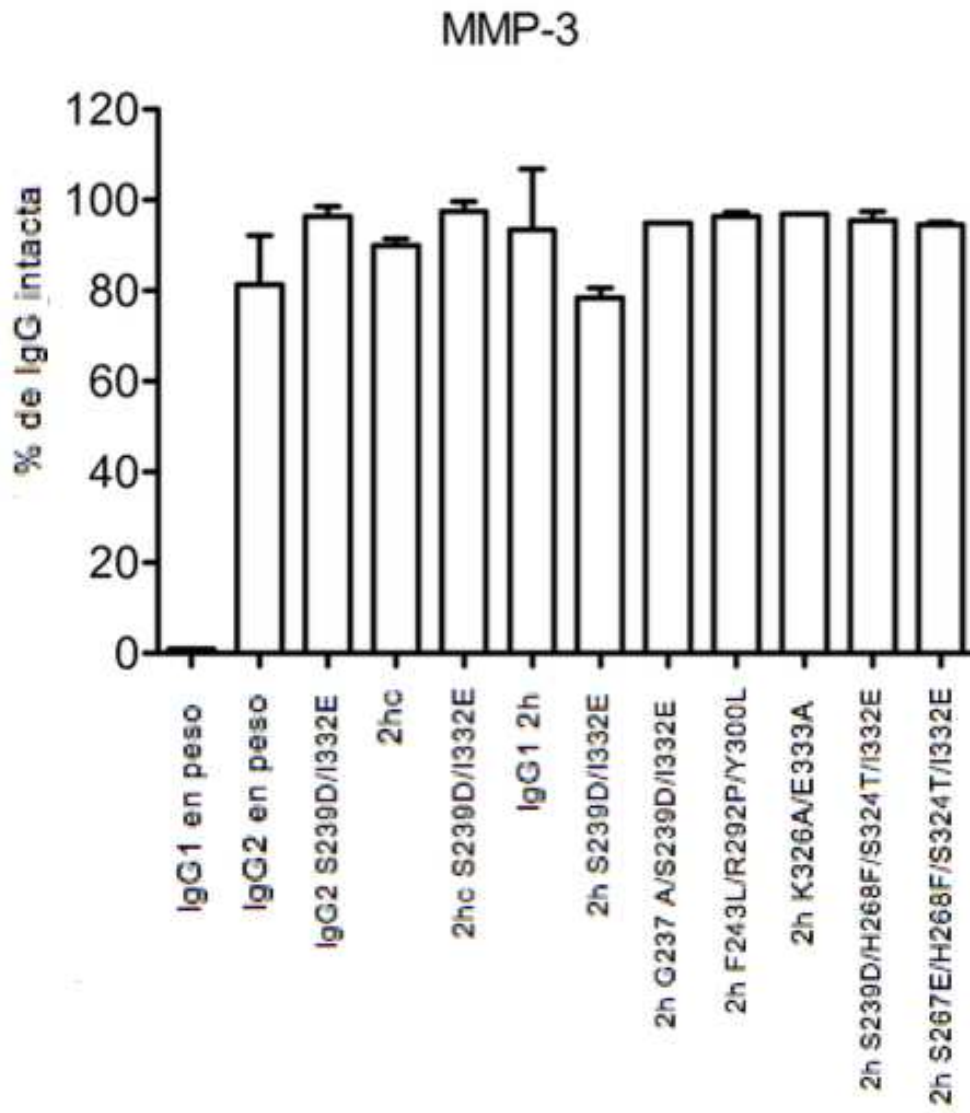
*Fig. 4A*



**Fig. 4B**



*Fig. 4C*



**Fig. 4D**

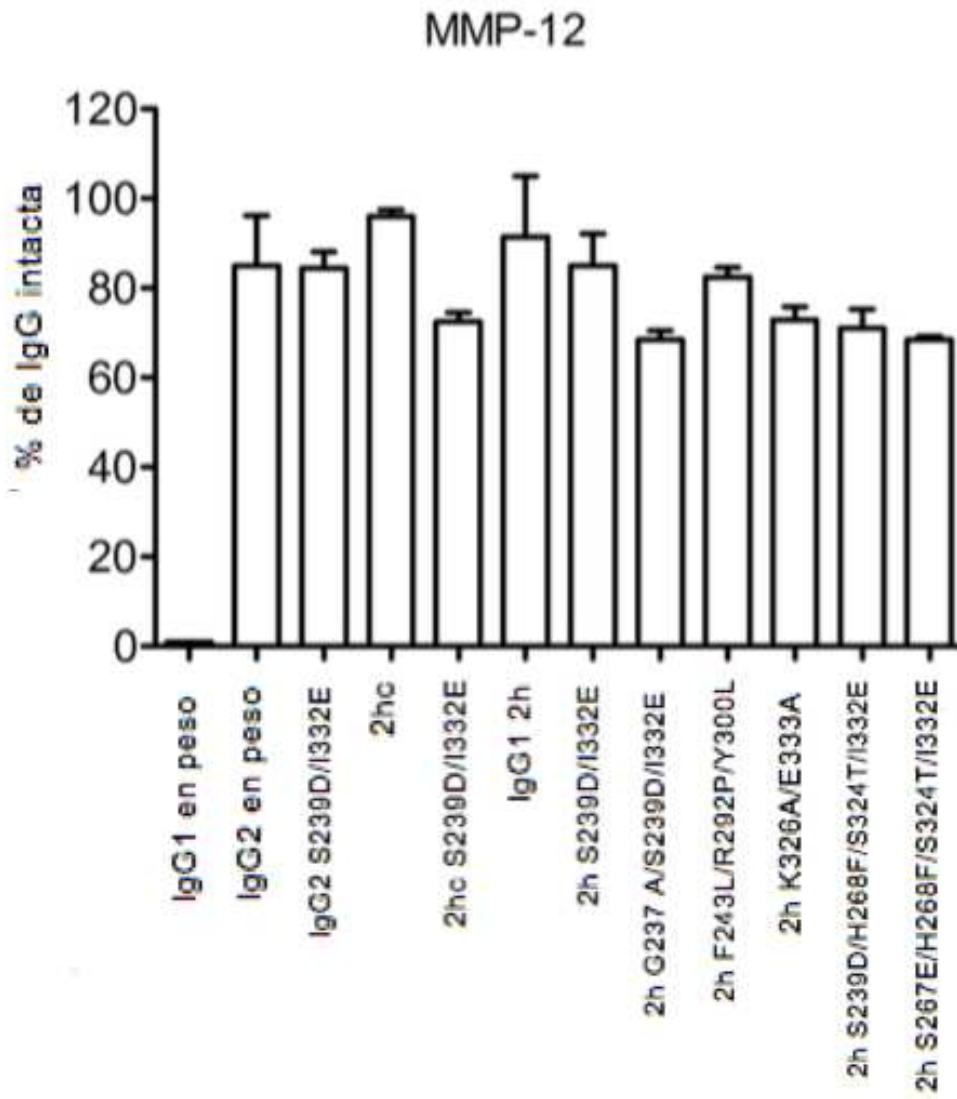
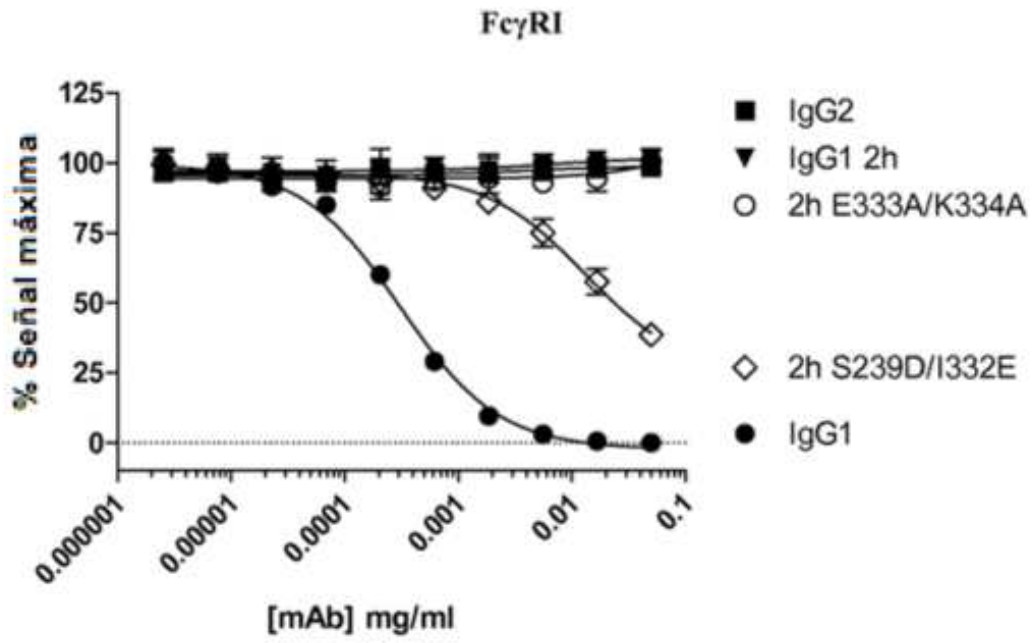


Fig. 5A



*Fig. 5B*

FcγRIIa

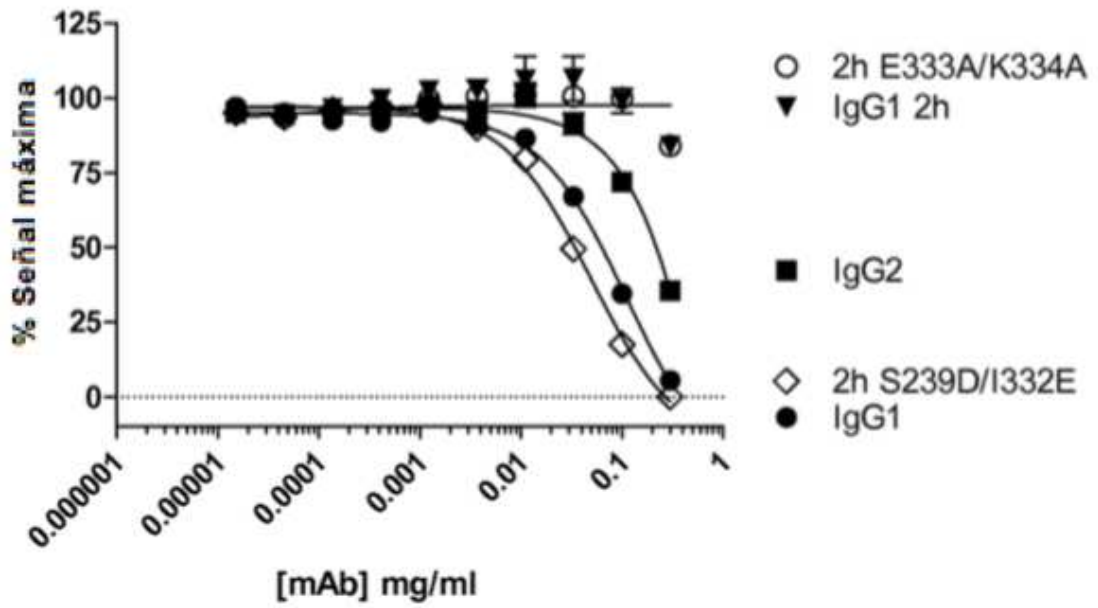
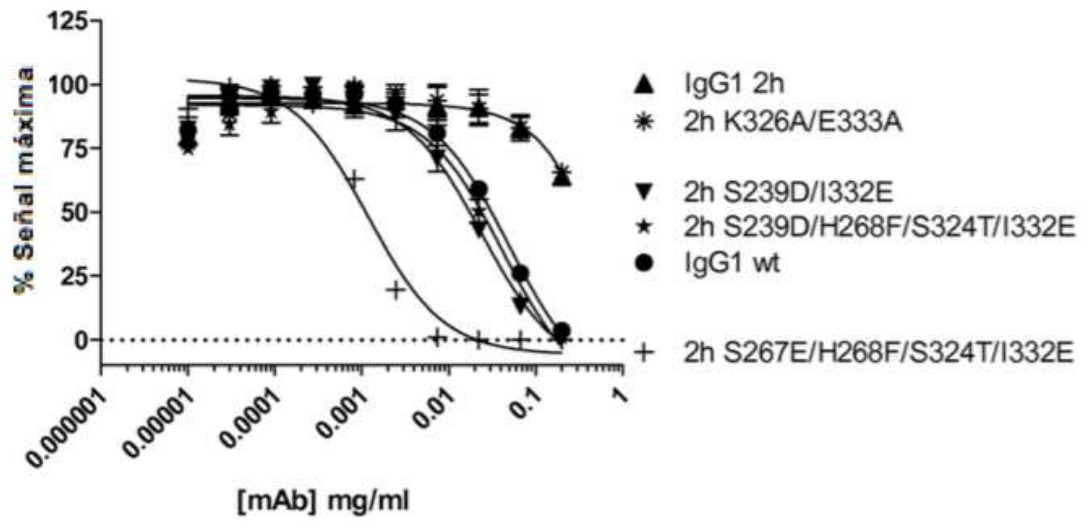


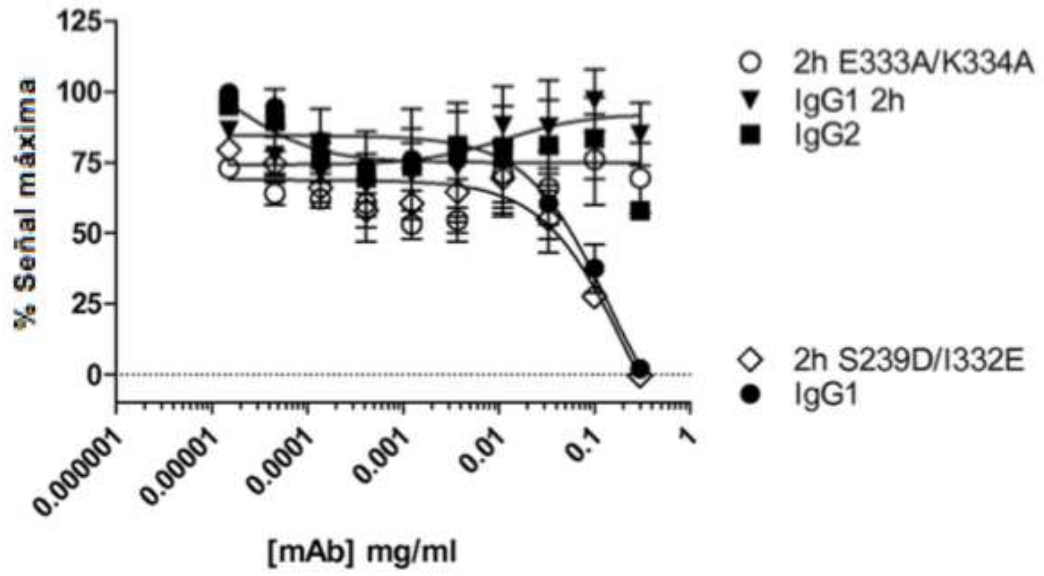
Fig. 5C

FcγRIIa



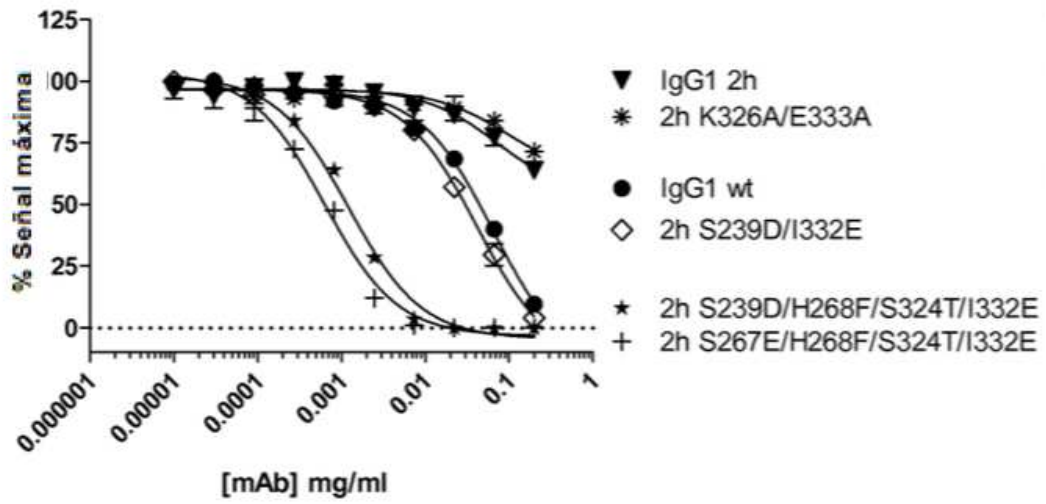
*Fig. 5D*

FcγRIIb



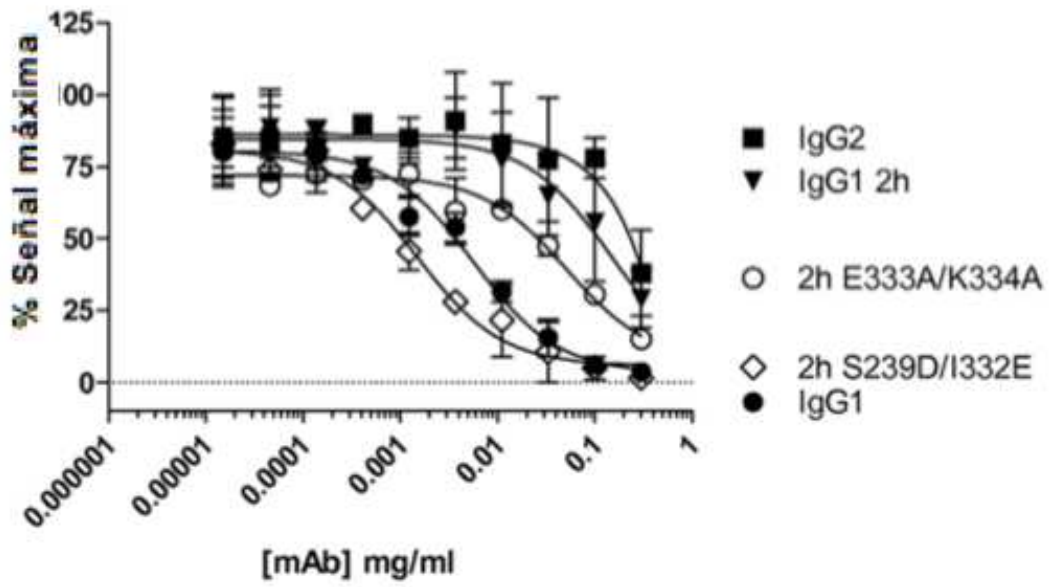
*Fig. 5E*

FcγRIIb



*Fig. 5F*

FcγRIIIa



*Fig. 5G*

FcγRIIIa

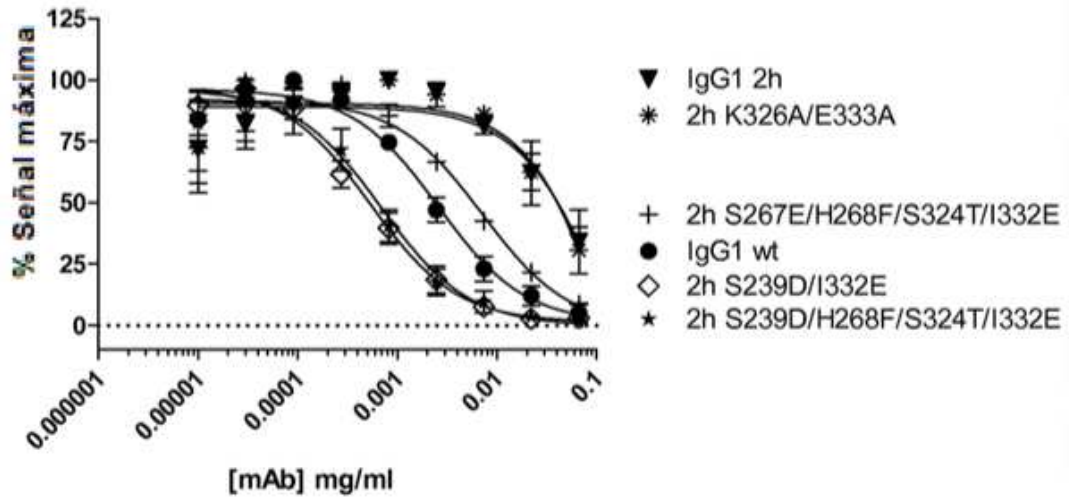
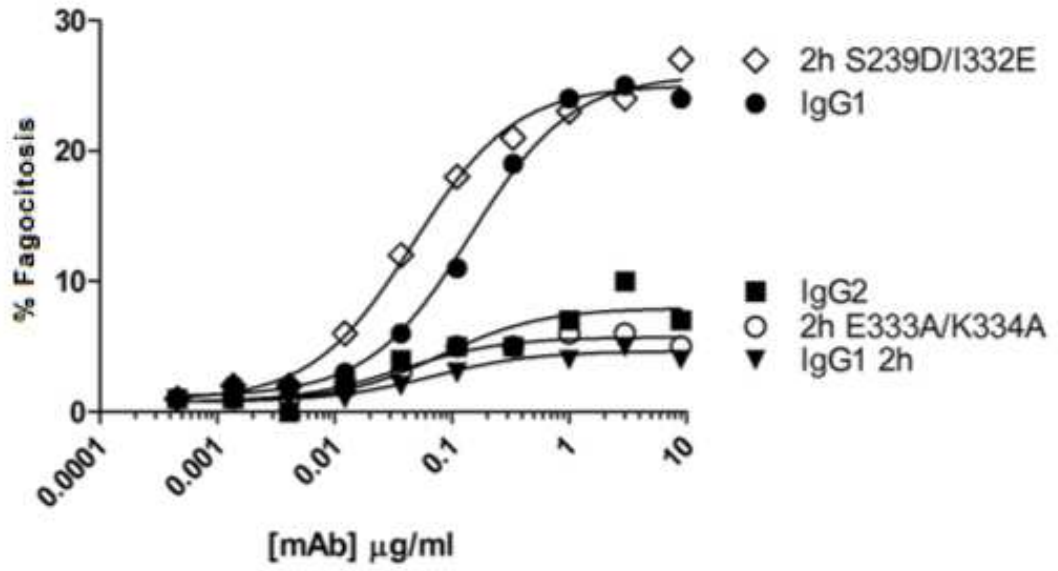


Fig. 6A



*Fig. 6B*

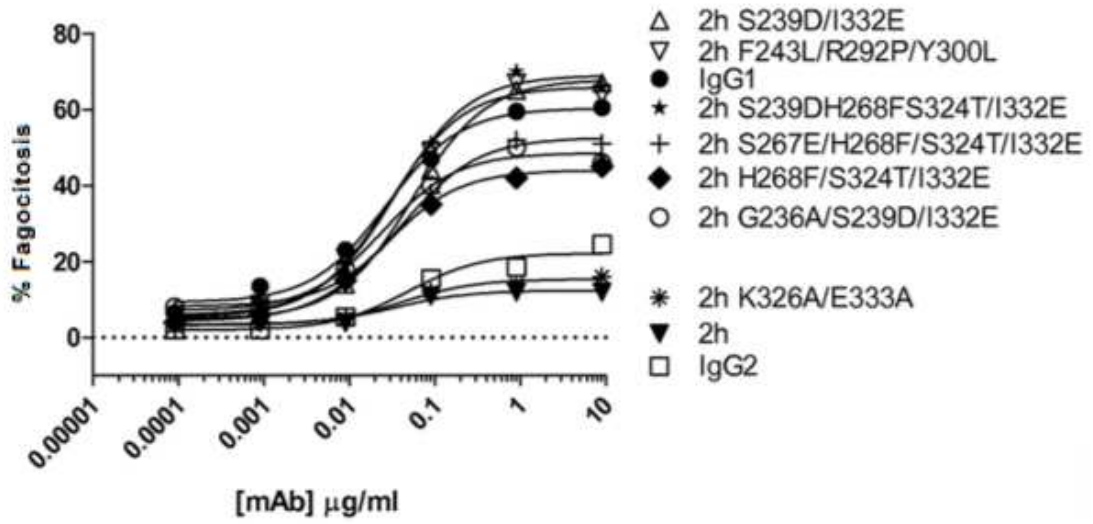


Fig. 6C

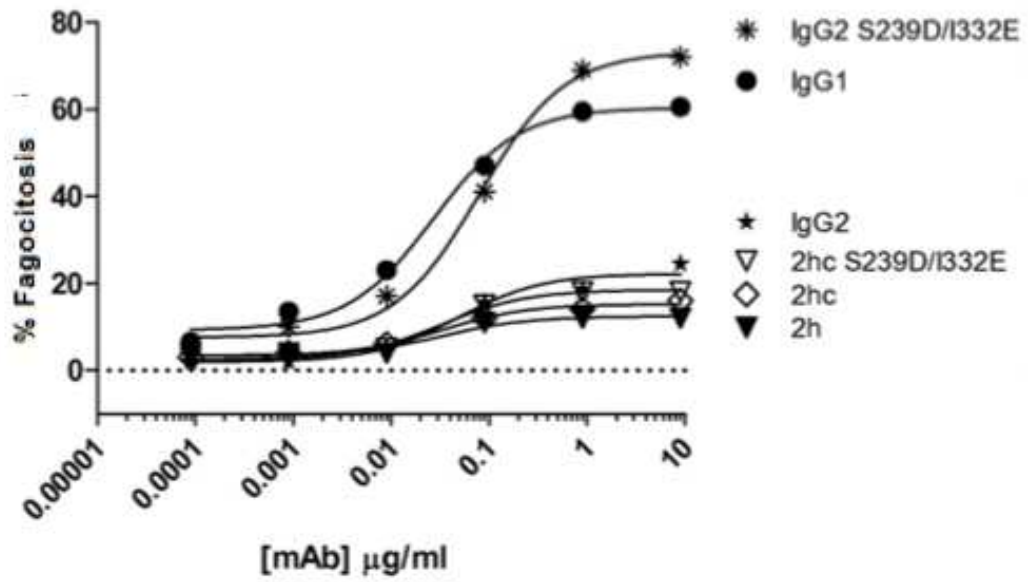


Fig. 7A

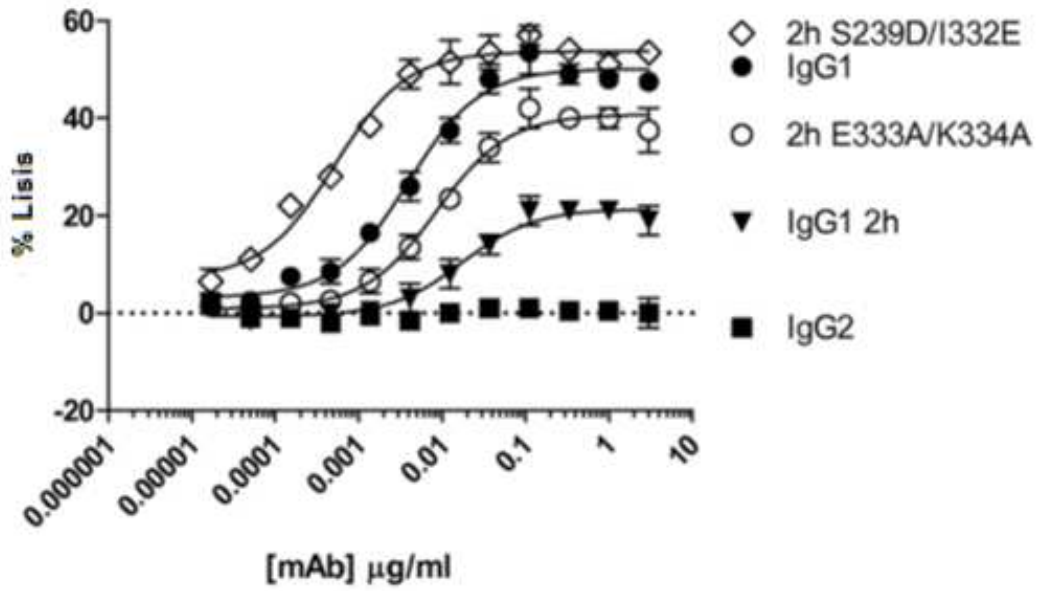


Fig. 7B

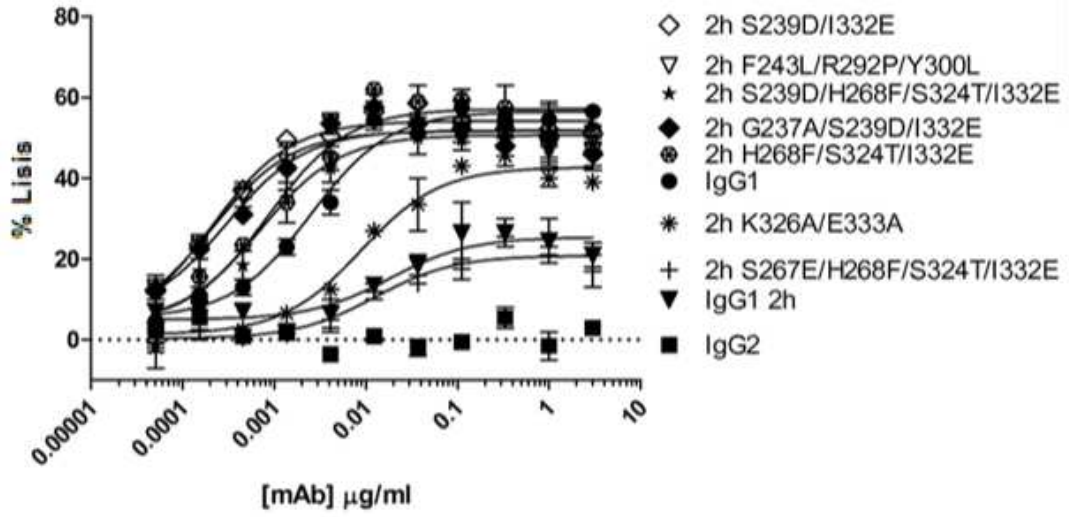


Fig. 7C

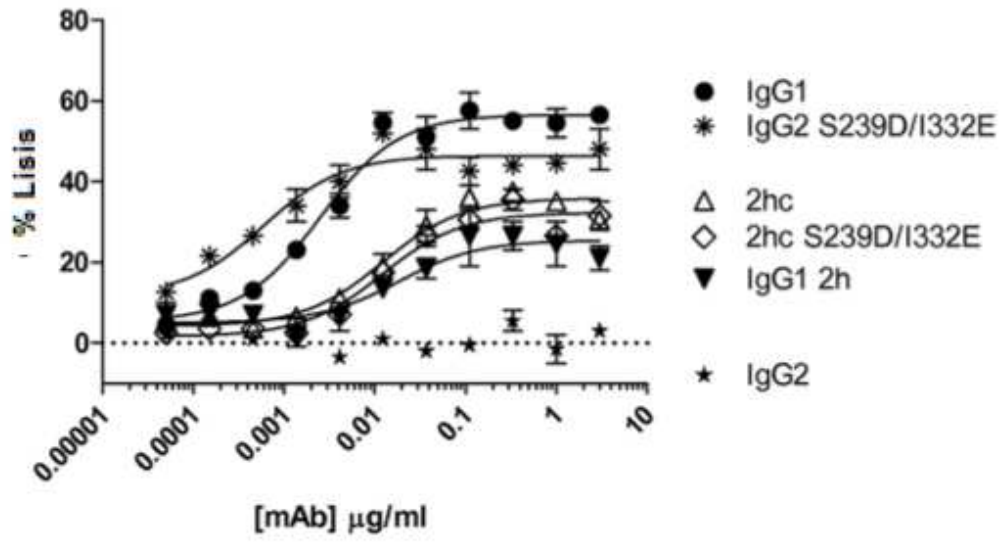


Fig. 8

