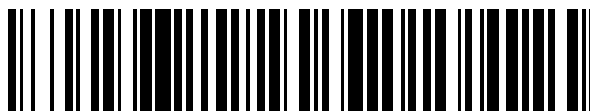


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 549**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2010** **E 16194473 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 3141260**

54 Título: **Mutantes de anticuerpos Fc con funciones efectoras ablacionadas**

30 Prioridad:

**30.11.2009 US 265079 P**

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

**01.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STROHL, WILLIAM y**  
**VAFA, OMID**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 751 549 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Mutantes de anticuerpos Fc con funciones efectoras ablacionadas

**5 ANTECEDENTES****Campo**

10 La descripción se refiere a las regiones constantes de IgG2 anticuerpo humano (regiones Fc) mutados de tal manera que sustancialmente pierden la capacidad de unirse específicamente receptores Fcγ o activar respuestas mitogénicas de las células inmunes por reticulación mediada de receptor Fc de los antígenos diana de superficie. La descripción también proporciona nuevos anticuerpos en los que pueden incorporarse las regiones constantes de IgG2 mutadas.

**15 Discusión del campo**

Los anticuerpos que se dirigen a los antígenos de superficie de células desencadenan funciones efectoras no deseadas inmunoestimulantes y asociadas con acoplamiento de receptor Fc (FcR) en las células inmunes y la activación del complemento. Como anticuerpos terapéuticos y construcciones de fusión Fc destinadas a dirigir y activar o neutralizar las funciones de ligando diana pero no dañan o destruyen las células o tejidos locales que se necesitan, se han buscado mutantes Fc con funciones efectoras ablacionadas.

25 Isotipos de IgG humana (las subclases de anticuerpos maduros de clase G de globulina gamma; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) exhiben la capacidad diferencial para reclutar funciones inmunes, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por ejemplo, IgG1 e IgG3), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por ejemplo, IgG1, IgG3). Acoplamiento específico de isotipo de tales funciones inmunitarias se basa en la selectividad para los receptores Fc en distintas células inmunitarias y en la capacidad para unir C1q y activar el conjunto de un complejo de ataque de membrana (MAC). Entre los diversos isotipos, la afinidad relativa por los receptores Fcγ (por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa/b/c, FcγRIIIa/b) es alta para IgG1 y IgG3, sin embargo, hay una afinidad mínima para IgG2 (restringido a FcγRIIIa 131H polimorfismo), e IgG4 solamente tiene afinidad medible FcγRI. Usando análisis de secuencias comparativas y estructuras cocrísticas, los residuos de contacto clave para la unión al receptor se han mapeado a los residuos de aminoácidos que abarcan la bisagra inferior y la región CH2. Usando técnicas estándar de ingeniería de proteínas, se ha conseguido cierto éxito en la mejora o reducción de la afinidad de una preparación de anticuerpos para receptores Fc y el componente C1q de complemento.

Entre los isotipos, IgG2 es menos capaz de unirse a la familia de receptores de Fc. Usando IgG2 como punto de partida, se han hecho esfuerzos para encontrar un mutágeno con funciones efectoras disminuidas pero que retiene la unión a FcRn, estabilidad prolongada y baja inmunogenicidad. Los mutantes mejorados de esta naturaleza pueden proporcionar terapéuticos de anticuerpo mejorados con seguridad retenida.

45 US 5.834.597 da a conocer regiones constantes de IgG2 mutada y anticuerpos de anti-CD3 que las incorporan. El documento US 2007/148167 describe un anticuerpo no inmunoestimulador. El documento US 2007/036799 describe identificación e ingeniería de anticuerpos con regiones de Fc variantes. El documento WO 2006/019447 describe variantes de Fc. El documento WO 2009/052439 describe métodos de inmunoterapia de Alzheimer y enfermedades similares. El documento US 2007/009523 describe variantes de polipéptidos con una función efectora alterada. El documento WO 2009/100309 describe anticuerpos anti-IFNAR1 modificados. An et al. (2009) mAbs 1 (6): 572 - 9 describe un isotipo de anticuerpo manipulado. Seth et al. (2001) Clinical Immunology 131: 588 describe la mutación P331S en el dominio Fc de una proteína anti-CD20 SMIP<sup>TM</sup>. Armor et al. (1998) European Journal of Immunology 29 (8): 2613 - 2624 describe moléculas de IgG humana recombinante.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

55 La presente invención proporciona una molécula que contiene Fc que tiene afinidad disminuida por al menos un receptor de Fcγ en comparación con un Fc de tipo salvaje, que comprende un dominio Fc de anticuerpo con una región constante de IgG mutada, en donde los residuos de aminoácidos 234, 235 y 237 definidos por el sistema de numeración EU comprende AAA, y en donde el dominio Fc comprende además:

- 60 (a) las mutaciones H268A, A330S y P331S definidas por el sistema de numeración EU, o  
(b) las mutaciones H268A o H268Q, V309L, A330S y P331S como se definen por el sistema de numeración EU.

65 La presente invención también proporciona una molécula de unión basada en polipéptido recombinante que comprende: (i) un dominio de unión capaz de unirse a una molécula objetivo, y (ii) un dominio Fc que tiene una secuencia de aminoácidos homóloga a todos o parte de un dominio constante CH2 y CH3 de una cadena pesada de

inmunoglobulina humana y en donde los residuos 234, 235 y 237 definidos por el sistema de numeración EU comprenden AAA; en donde la molécula de unión es capaz de unirse a la molécula objetivo sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa, o la destrucción mediada por células del objetivo, y en donde el dominio Fc comprende además:

- (a) las mutaciones H268A, A330S y P331S definidas por el sistema de numeración UE, o
- (b) las mutaciones H268A o H268Q, V309L, A330S y P331S como se define por el sistema de numeración de EU.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula que contiene Fc de la invención o la molécula de unión de la invención.

La presente invención también proporciona la molécula que contiene Fc, la molécula de unión o la composición farmacéutica de la invención para su uso en terapia.

La presente divulgación proporciona las composiciones de dominios constantes de inmunoglobulina glicosilada modificada útiles en ingeniería de anticuerpos o agentes terapéuticos similares a anticuerpos, tales como los que comprenden una región Fc, y dirigiendo ligandos de superficie celular. La composición de la divulgación es un mutante Fc de IgG2 que exhibe capacidad de unión FcγR disminuida, pero tienen unión a FcRn conservada. Estos mutantes Fc de IgG permiten el direccionamiento terapéutico de antígenos solubles o de superficie celular al tiempo que minimizan el compromiso asociado con Fc de la función efectora inmune y la citotoxicidad mediada por el complemento. En un aspecto, el mutante Fc de IgG2 comprende V234A, G237A, P238S de acuerdo con el sistema de numeración EU. En otro aspecto, el mutante Fc de IgG2 comprende V234A, G237A, H268Q o H268A, V309L, A330S, P331S de acuerdo con el sistema de numeración EU. En un aspecto particular, el mutante Fc de IgG2 comprende V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S y, opcionalmente, P233S de acuerdo con el sistema de numeración EU.

En una realización, las composiciones mutantes Fc de IgG2 se utilizan en indicaciones en las que la retención de vida media de anticuerpo terapéutico (o de fusión de Fc) se conserva a través de interacciones con FcRn, mientras que la toxicidad potencial deriva de la activación de FcγRs asociado con funciones inmunes y efectoras tales como i) citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), ii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), iii) fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), iv) activación celular mediada por FcR (por ejemplo, liberación de citoquinas mediante reticulación FcR), v) activación/agotamiento de plaquetas mediado por FcR se minimiza o elimina. En un aspecto, las mutaciones Fc de IgG2 se incorporan en anticuerpos terapéuticos o fusiones Fc de aglutinantes, tales como aglutinantes multivalentes, dirigiendo ligandos sobre células implicadas en trastornos neurológicos, tales como ganglio de células basales; trastornos del sistema inmune tales como los relacionados con la activación de células B o células T, o a células implicadas en la reparación o cicatrización de tejidos, tales como fibroblastos o células madre.

En otra realización, el mutante Fc de IgG2 comprende una composición farmacéutica. En otra realización, el mutante Fc de IgG2 comprende una porción de una molécula farmacéuticamente activa. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas que comprenden el mutante IgG2Fc o las moléculas que contienen mutantes de IgG2Fc activo son útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la migración y concentración de macrófagos o monocitos. En un aspecto, las moléculas que comprenden mutantes Fc de IgG2 son útiles para unir un blanco dentro de un tejido neurológico, un tejido endocrino, un tejido vascular, un tejido cardíaco, un tejido sinovial, un tejido dérmico o un tejido mucoso. Uno de los muchos usos de los mutantes Fc de IgG2 de la invención está en el tratamiento de la enfermedad de huésped de injerto-v; enfermedad de injerto de huésped; rechazo de trasplante de órganos; rechazo de trasplante de médula ósea; autoinmunidad tal como vasculitis, anemia hemolítica autoinmune, trombo-citopenia autoinmune y artritis; aloinmunidad, tal como trombocitopenia aloimune fetal/neonatal; asma y alergia; enfermedades inflamatorias crónicas o agudas tales como enfermedad de Crohn o esclerodermia; enfermedad de Alzheimer, oclusión de la arteria coronaria.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**FIG 1** muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de IgG2 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), IgG4 (SEQ ID NO: 2), y IgG1 (SEQ ID NO: 3) que muestra la correspondiente numeración de la UE para cada residuo; la región bisagra de la IgG2 comienza en el residuo 218 de la UE.

**FIG 2** muestra la estructura de un fragmento Fc que muestra las posiciones de la superficie de los residuos modificados (numeración UE).

**FIGs 3A-C** son gráficos que muestran la competencia de cada isotipo y mutante construido como un anticuerpo de unión anti-Her2/neu con el anticuerpo del isotipo IgG1 de tipo silvestre humano usando la plataforma de ensayo de bolas AlphaScreen: FcγRI (no mostrado), FcγRIIa (A), FcγRIIb (B), FcγRIIIa (no mostrado), y FcRn (C).

**FIGs 4A-C** son gráficos que muestran la unión directa de cada isotipo y mutante construido como un anticuerpo de unión anti-Her2/neu usando el ensayo de bolas AlphaScreen: FcγRIIIa (A), FcγRI (B), y FcγRIIa (C).

**FIG 5** muestra los resultados de un ensayo de ADCC y isotipos y mutantes seleccionados construido como un anticuerpo de unión anti-Her2/neu y el uso de las PBMC humanas (25X exceso) y células de cáncer de mama SK-Br3 como objetivos.

**FIG 6** muestra los resultados de un ensayo de CDC de constructos anti-CD20 seleccionados usando complemento humano y las células de linfoma WIL2-S como objetivos.

**FIG 7** muestra los resultados de un ensayo de ADCP de un análisis de citometría de flujo de constructos anti-Her2/neu utilizando células diana Sk-Br3 y macrófagos diferenciados GM-CSF.

**FIG 8** es un gráfico que muestra la liberación de citoquinas (TNF $\alpha$ ) a partir de las 24 horas después de la estimulación de PBMC con perlas unidas a isotipos de IgG para diversas construcciones, incluyendo IgG2 de tipo silvestre y seis mutantes.

**FIG 9** es un gráfico de la media de números de células B circulantes en el tiempo en grupos de monos cinomólogos inyectados con constructos de anticuerpo de dominio de unión anti-CD20 con varias regiones Fc o que carece de una región Fc (Fab')<sub>2</sub>.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

| SEQ ID NO: | Descripción                                                               | Características                                                                                                                                                                                |
|------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | IgG2 - Fc; Ig humana clase gamma, bisagra subclase 2, dominios CH2 y CH3  | El residuo 1 corresponde a la UE 218, los residuos 13-17 pueden ser PVAGP (peso), PAAAP, PAAAS y SAAAS; El residuo 47 puede ser H (peso), Q, o A; El residuo 109-110 puede ser AP (peso) o SS. |
| 2          | IgG4 - Fc; Ig humana Clase gamma, subclase 4, bisagra, dominios CH2 y CH3 | El residuo 1 corresponde a la UE 218                                                                                                                                                           |
| 3          | IgG1 - Fc; Clase gamma humana, subclase, bisagra, dominios CH2 y CH3      | El residuo 1 corresponde a la UE 218                                                                                                                                                           |
| 4          | PAAAP                                                                     | Residuos de la región constante de IgG mutada 233, 234, 235, 237 y 238                                                                                                                         |
| 5          | PAAAS                                                                     | Residuos de la región constante de IgG mutada 233, 234, 235, 237 y 238                                                                                                                         |
| 6          | SAAAS                                                                     | Residuos de la región constante de IgG mutada 233, 234, 235, 237 y 238                                                                                                                         |

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

##### Abreviaturas

ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; ADCP, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos; CDC = citotoxicidad dependiente del complemento; IgG = inmunoglobulina G; ITAM = motivo de activación de tirosina inmunoreceptora; ITIM = motivo inhibitorio de inmunoreceptor tirosina; Mab = anticuerpo monoclonal; FDCR = liberación de citoquinas dependiente de Fc; FcyR, Fc $\gamma$ R o Fc $\gamma$ gammaR = receptor gamma Fc

##### Definiciones y Explicación de la Terminología

"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 asesinas naturales (NK), neutrófilos, y Macrófagos) que permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que lleva el antígeno y posteriormente matar a la célula diana con citotoxinas. Anticuerpos de IgG de alta afinidad específicos de ligando dirigidos a la superficie de las células diana estimulan las células citotóxicas y absolutamente se requieren para tal eliminación. La liposis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo de célula a célula y no implica complemento.

La capacidad de cualquier anticuerpo concreto para mediar en 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 inmunitarias, que pueden ser activadas por los complejos de anticuerpo de antígeno dando como resultado una 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 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.

"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 de unión C1q al anticuerpo Fc.

Los términos "Fc", "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc" tal como se utiliza aquí, se refieren a una proteína monomérica, dimerica o heterodimerica que tiene al menos una inmunoglobulina CH2 y dominio CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dimerica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria es una forma específica de Fc que contiene proteína que comprende al menos un dominio de unión de ligando que conserva una homología sustancial con al menos una cadena pesada o ligera del anticuerpo del dominio variable de al menos una especie de anticuerpos animales.

"Región Fc de IgG2 humana de tipo silvestre" se refiere a una región Fc de IgG humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un fragmento del mismo, que es residuo K218 a 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, IgG1 de UE (véase Cunningham et al., 1970 J. Biol. Chem., 9: 3161-70). Es decir, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo están alineadas con cadenas pesadas y ligeras de 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 EU se utiliza convencionalmente en la técnica (véase generalmente Kabat et al, Sequences of Protein of Immunological Interest, Publicación NIH N° 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1991). De acuerdo con esta convención, la región constante de IgG2 de tipo silvestre descrita carece de un aminoácido en la posición 236 (FIG 1, SEQ ID NO: 1).

#### Visión de conjunto

La presente invención fue motivada por un interés en la identificación de un dominio Fc para su uso en la fabricación de anticuerpos terapéuticos, fusiones de Fc, y productos biofarmacéuticos iguales con una mayor seguridad en cuanto a la imposibilidad de causar la liberación de citoquinas o daños o matan ligando diana, mostrando las células y tejidos que rodean las células objetivo.

Los anticuerpos de isotipo IgG4 humano y las proteínas de fusión Fc no recaban ADCC significativa (por NKs, expresando exclusivamente FcγRIIIa), pero retienen la capacidad de inducir la fagocitosis (ADCP) por los macrófagos (que expresan FcγRI, IIa y IIIa) y posiblemente activan monocitos cuando estén en un complejo inmune y atribuible a la distribución de la activación de FcγRs en las células inmunes específicas. Los esfuerzos para minimizar la actividad residual dieron como resultado un desarrollo y uso de un mutante que comprende V234A, L235A (ala/ala) en el IgG4Fc de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2).

Armour et al generaron múltiples mutaciones puntuales en IgG2 para minimizar la unión a FcγRI (Armour et al, 1999) y FcγRIIa y IIIa (Armour et al. 2003). Las mutaciones adicionales descritas en la solicitud de patente de Mueller et al. (PCTWO97/11971) se derivan de híbridos de IgG2/IgG4, consistentes en un dominio CH2 de IgG2 y CH3 de IgG4, específicamente los residuos 330 y 331 son de IgG4 en mutantes IgG2 de la presente descripción. También se han utilizado esfuerzos de silenciamiento para disminuir los efectos inmunoestimuladores. IgG2 o IgG4 o intercambio de dominio entre las dos subclases para generar mAbs con una función efectora mínima en IgG1 (Tao et al., 1991). La solicitud de patente de Strohl (US2007/0148167) describe cuatro mutaciones en IgG2 en los residuos de las posiciones EU 268, 309, 330 y 331. Shields et al. (2001) describe una sustitución adicional, H268A.

La presente divulgación es una demostración por primera vez de las sustituciones en múltiples posiciones de las regiones constantes de IgG2 (Fc) con residuos IgG4 de H268Q o A, V309L, A330 y P331 S según el sistema de numeración de Kabat/UE. La selección dirigida de múltiples sustituciones de residuos proporcionó inesperadamente un dominio Fc funcional para su uso en la ingeniería de anticuerpos y se usó como un polipéptido de fusión, así como la posibilidad de proporcionar una entidad terapéutica que carece de función efectora medible.

Se seleccionaron los mutantes multi-sustituidos IgG2 en las bases de sus afinidades relativas para FcR humano (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn) evaluados por ensayos de competición Alpha Screen y análisis SPR/Biacore. Estos mutantes se ensayaron adicionalmente y se calificaron en los sistemas celulares apropiados para su capacidad de inducir CDC, ADCC y ADCP, así como de activar secreción de TNF-α por PBMCs. En el conjunto de datos experimentales proporcionados en este documento, los mutantes de IgG2 se compararon con preparaciones o mutantes conocidos incluyendo; IgG1 ag e IgG4 Ala/Ala además de IgG1 e IgG2 de tipo silvestre. Otros análisis de estos mutantes en varios bioensayos *in vitro* demostraron que niveles mínimos e indetectables de actividad y afinidad de unión de ablación por FcR. Basándose en estas pantallas, se ha identificado un mutante Fc

de IgG2, designado como IgG2c4d, que no tiene afinidad detectable ni avidez para FcRs (unión de monómero frente a ligando bi-multimérico) y está desprovisto de actividad en los diversos bioensayos efectores/inmunoestimulantes antes mencionados. El IgG2c4d Fc comprende las sustituciones de alanina, serina y leucina: V234A, G237A, P238S, H28A, V309L, A330S, P331S (numeración UE). Los IgG2, IgG2c4d sustituidos por siete residuos pueden ser considerados el primer Fc "silenciado" en su incapacidad para unir FcRs, mediar funciones efectoras, o iniciar liberación de citoquinas mediada por Fc.

Sobre la base del presente descubrimiento, los subconjuntos de las siete mutaciones de IgG2c4d se pueden utilizar, o en combinación con otros mutantes de aminoácidos, o las mutaciones pueden ser usadas en otro isotipo IgG para conseguir silenciamiento similar o selectivo de funciones efectoras tal como se enseña en el presente documento y en combinación con lo que se conoce en la técnica.

Como se ejemplifica en este documento específicamente, las sustituciones de triplete V234A, G237A, P238S reducen afinidad de unión FcγRIIIa y avidez de unión FcγRIIIa y ablación ADCC y liberación de citoquinas dependiente de Fc, mientras que el mantenimiento de la afinidad de unión a FcRn de la molécula.

Tabla 1. Resumen de la afinidad de unión relativa de Biacore.

| Isotipo/Variante  | FcγRI | FcγRIIIa | FcγRIIIa |
|-------------------|-------|----------|----------|
| IgG1              | +++++ | +++      | +++      |
| IgG1 agly (N297A) | +++   | -        | +/-      |
| IgG4 S>P, ala/ala | +++   | -        | +/-      |
| IgG2              | -     | +++      | +/-      |
| IgG2m4            | -     | +++      | +/-      |
| IgG2c4a           | -     | +++      | +/-      |
| IgG2c4b           | +     | -        | +/-      |
| IgG2c4d           | -     | -        | -        |
| IgG2c4e           | -     | -        | -        |

Tabla 2. Resumen de la avidez relativa.

| Isotipo/Variante  | Avidez FcγRI | Avidez FcγRIIIa | Avidez FcγRIIIa |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| IgG1              | +++++        | ++++            | +++             |
| IgG1 agly (N297A) | +++          | -               | -               |
| IgG4 S>P, ala/ala | +++          | ++              | -               |
| IgG2              | -            | +++             | -               |
| IgG2m4            | -            | +++             | -               |
| IgG2c4d           | -            | -               | -               |

Tabla 3. Resumen de las funciones efectoras y liberación de citoquinas (RC).

| Isotipo/Variante  | ADCC  | ADCP  | CDC   | Liberación de citoquinas |
|-------------------|-------|-------|-------|--------------------------|
| IgG1              | +++++ | +++++ | +++++ | +++++                    |
| IgG1 agly (N297A) | -     | +++   | -     | ++                       |
| IgG4 S>P, ala/ala | -     | ++    | -     | ++                       |
| IgG2              | -     | ++    | -     | +++                      |
| IgG2m4            | -     | ++    | -     | ++                       |
| IgG2c4d           | -     | -     | -     | -                        |

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

Los sitios de sustitución fueron seleccionados con base en el deseo de producir una composición que tiene las características estructurales de un Fc del anticuerpo nativo, unión conservada de FcRn, buena estabilidad, y una disminución de la capacidad para estimular la cascada del complemento, la lisis celular, fagocitosis celular o liberación de citoquinas.

Como anticuerpos de la clase IgG son bivalentes, que tiene dos dominios de Fv completos que constan de los dominios variables pesado y ligero en asociación funcional. La bivalencia proporciona efectos de avidéz, así como la capacidad de reticular el antígeno diana o los receptores Fc en las mismas células o células distintas, provocando de este modo un espectro de las bioactividades dirigidas por unión al receptor no objetivo de anticuerpos. Por esta razón, los mutantes Fc de la presente invención se ensayaron dentro de un "contexto de avidéz", lo que significa que los mutantes Fc de las IgG se multimerizaron en una superficie y se probaron la interacción con un multímero de receptores de Fc específicos.

## Caracterización Biológica de los Mutantes

Proteínas que contienen Fc se pueden comparar para la funcionalidad de varios ensayos *in vitro* bien conocidos. En particular, la afinidad para los miembros de la familia FcγRI, FcγRII y FcγRIII de los receptores Fcγ es de interés. Estas mediciones pueden realizarse utilizando formas solubles recombinantes de los receptores o formas asociadas a las células de los receptores. Además, la afinidad por FcRn, el receptor responsable de la semivida circulante prolongada de IgGs, se puede medir, por ejemplo, usando un formato de cordón unido a ligando de "ALFASCREEN" usando FcRn soluble recombinante. ALPHASCREEN, utilizado en el tamizado de alto rendimiento, es una tecnología de ensayo homogénea que permite la detección de eventos moleculares tales como la unión. Las bases recubiertas de "donante" y "aceptor" son la base de la tecnología de ensayo. Como ensayo basado en perlas, ALPHASCREEN funciona a través de la interacción de las perlas en estrecha proximidad, dando lugar a una cascada de reacciones químicas que actúan para producir una señal ampliamente amplificada. Pueden aplicarse mediciones directas o indirectas, por ejemplo, de unión competitiva, para evaluar afinidades relativas y avidéz entre proteínas.

La evolución natural de los isotipos IgG humanos (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), ha permitido a cada uno de exhibir un espectro diferente de la capacidad para reclutar funciones inmunes, tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos celulares (ADCC, por ejemplo, IgG1 y IgG3), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por ejemplo, IgG1, IgG3). El compromiso específico de isotipo de estas funciones se basa en la selectividad diferencial para los receptores Fc que reside en distintas células inmunitarias, así como en la capacidad para unirse a C1q y activar el ensamblaje de un complejo de ataque de membrana (MAC) resultando en CDC y CDP (fagocitosis dependiente de complemento) a través de componentes específicos del complemento de unión a receptores sobre macrófagos efectoras. La jerarquía de capacidad para unir el componente inicial, C1q, de la cascada del complemento, de isotipos humanos es IgG1> IgG3> IgG2> IgG4 aunque la activación del complemento por IgG2 e IgG4 en la infección microbiana está bien documentada.

Los ensayos funcionales basados en células, tales como ADCC y CDC, proporcionan una visión de las consecuencias probables funcionales de las estructuras variantes particulares. La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es una reacción mediada por células en las que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células aniquilantes naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan 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 en la FcγRIIIA que es el único receptor de tipo Fcγ que se conoce que se expresa por estas células.

Ensayos de fagocitosis también se pueden usar para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes mutantes, al igual que ensayos pueden que medir las respuestas celulares, tales como superóxido o liberación de mediadores inflamatorios. Los modelos *in vivo* han demostrado ser útiles en el estudio de variantes de Fc. Por ejemplo, como se ha demostrado usando mutantes de anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de células T en ratones, una actividad que depende de los dominios Fc de acoplamiento de ligandos específicos, tales como receptores Fcγ. Activación dirigida por el anticuerpo de los macrófagos media la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), causando células diana opsonizadas para ser envueltas y digeridas por los macrófagos. *In vitro*, macrófagos diferenciados que expresan altos niveles de FcR pueden diferenciarse en el fenotipo M1 usando IFNγ o GM-CSF a niveles expresados elevados de todas las FcR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa) en relación con los monocitos. Tales ensayos son conocidos por los expertos en la técnica de ingeniería de anticuerpos.

## Método de fabricación del anticuerpo

Se utilizaron procesos recombinantes de rutina para crear mutaciones dirigidas en las secuencias de los dominios constantes de IgG2 humana utilizadas como punto de partida en la generación y análisis de mutantes Fc. Se apreciará para los expertos en la técnica que pueden usarse diversas técnicas para crear cambios en las secuencias de codificación para crear vectores adecuados para la expresión de las secuencias de aminoácidos deseadas en una variedad de células huésped para su recuperación y ensayo.

## Selección de Células Hospitales o Ingeniería de Células Hospitales

Como se describe en el presente documento, la célula hospedadora elegida para la expresión de la proteína que contiene Fc recombinante o anticuerpo monoclonal 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 el Dominio de la inmunoglobulina CH2. De este modo, un aspecto de la descripción implica la selección de células huésped apropiadas para uso y/o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

Además, la célula huésped puede ser de origen mamífero o se puede seleccionar de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insecto o de planta, o cualquier derivado, célula inmortalizada o transformada de la misma.

Alternativamente, la célula huésped se puede seleccionar de una especie u organismo incapaz de polipéptidos de glicosilación, por ejemplo, una célula procariota o un organismo, tales como *E. coli spp*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp* natural o construida.

### Anticuerpos

Un anticuerpo descrito en esta solicitud puede incluir 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 e incluye anticuerpos, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras porciones especificadas y variantes de los mismos aislados de humano, primate, roedor, mamífero, quimérico, humanizado y/o injertado con CDR.

Los anticuerpos, proteínas que comprenden Fc, o fragmentos de Fc descritos en este documento se pueden derivar de varias maneras bien conocidas en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos se obtienen convenientemente a partir de hibridomas preparados mediante inmunización de un ratón u otro animal con los péptidos, células o extractos de tejidos diana. Por lo tanto, los anticuerpos se pueden obtener usando cualquiera de las técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, anticuerpos, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc o componentes y dominios de los mismos también pueden ser obtenidos a partir de la selección de bibliotecas de tales dominios o componentes, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Se puede crear una biblioteca de fagos insertando una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, tal como a partir de las células B de un animal inmunizado o humano (Smith, GP 1985. Science 228: 1315-1317). Las bibliotecas de fagos de anticuerpos contienen pares de regiones variables de cadena pesada (H) y ligera (L) en un fago permitiendo la expresión de fragmentos Fv de cadena sencilla o fragmentos Fab (Hoogenboom et al., 2000, Immunol. Today 21 (8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede manipularse para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos monoclonales humanos deseables adicionales. Por ejemplo, los genes codificantes de la cadena pesada (H) y de la molécula de inmunoglobulina de cadena ligera (L) pueden mezclarse aleatoriamente (mezclar) para crear nuevos pares HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Además, uno o ambos genes de codificación de la cadena H y L pueden mutagenizarse en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina y, a continuación, se examinan en busca de capacidades de afinidad y neutralización deseables. Las bibliotecas de anticuerpos también pueden crearse sintéticamente seleccionando una o más secuencias estructurales humanas e introduciendo colecciones de cassettes CDR derivadas de repertorios de anticuerpos humanos o mediante variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13: 598-602). Las posiciones de diversidad no se limitan a las CDR, sino que también pueden incluir los segmentos estructurales de las regiones variables o pueden incluir regiones distintas de las variables de anticuerpo, tales como péptidos.

Otras bibliotecas de componentes de unión a diana que pueden incluir variables distintas de las regiones de anticuerpos son muestra de ribosoma, muestra de levadura, y muestras bacterianas. La visualización de ribosomas es un método para traducir ARNm en sus proteínas afines mientras mantiene la proteína unida al ARN. La secuencia codificante de ácido nucleico se recupera mediante RT-PCR (Mattheakis, LC et al., 1994. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 9022). La exposición a levaduras se basa en la construcción de proteínas de fusión del receptor de adhesión de levadura alfa-aglutinina asociado a la membrana, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo de apareamiento (Broder et al., 1997) Nature Biotechnology, 15: 553-7). La exposición bacteriana se basa en la fusión del objetivo con proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o la pared celular (Chen y Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79: 496-503).

En comparación con la tecnología de hibridomas, fagos y otros métodos de presentación de anticuerpos permiten la oportunidad de manipular la selección contra el antígeno diana *in vitro* y sin la limitación de la posibilidad de efectos de acogida en el antígeno o viceversa.

La divulgación también proporciona 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 procariota, eucariota o filamentosa de fago, secreción y/o la visualización de las composiciones o mutágenos dirigidos.

#### Uso de las moléculas que contienen Fc

Las composiciones (anticuerpos, fusiones de Fc, fragmentos de Fc) generadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente se pueden usar para diagnosticar, tratar, detectar o modular la enfermedad humana o patologías específicas en las células, tejidos, órganos, fluidos, o, generalmente, un huésped. Como se describe en este documento, la modificación de la porción Fc de un anticuerpo, proteína de fusión Fc o fragmento Fc para reducir o ablar la unión al receptor Fc gamma y funciones efectoras especificadas, pero donde el anticuerpo retiene las propiedades originales de direccionamiento, proporciona anticuerpos y construcciones Fc con un espectro superior de las actividades, las propiedades biofísicas, la estabilidad y la capacidad de persistir en el cuerpo de un huésped.

Las enfermedades o patologías que pueden ser susceptibles de tratamiento usando una composición proporcionada por la descripción incluyen, pero no se limitan a: trastornos neurológicos, tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer e incluyendo dolor neuropático; enfermedad dermatológica; enfermedades metabólicas; osteoartritis; y las condiciones resultantes de quemaduras o lesiones; trastornos cardiovasculares incluyendo, pero sin limitarse a, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico y hemorragia; Así como trastornos generales mediados por el sistema inmune, incluyendo las enfermedades reumáticas, la psoriasis y la esclerodermia.

Aunque se ha descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se describirán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitativos del alcance de las reivindicaciones.

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

Se construyeron una serie de constructos con mutaciones derivadas de un anticuerpo IgG2 humano como se muestra en la Tabla 4 usando métodos recombinantes estándar. Para anticuerpos con dominios variables completos, se usaron las secuencias CDR conocidas de anticuerpos anti-HER2 y anti-CD20 para construir isotipos y mutantes Fc como se indica. Los mutantes de anticuerpo se expresaron transitoriamente en células 293T usando procedimientos clonados y de expresión estándar. Los MABs se purificaron usando columnas de proteína A hasta más del 95% de homogeneidad antes de otros análisis experimentales.

Tabla 4.

| Subclase y designación | Mutaciones (numeración EU)                             |
|------------------------|--------------------------------------------------------|
| IgG1                   |                                                        |
| IgG1 Ag                | N297A                                                  |
| IgG4 A/A               | S228P, F234A, L235A                                    |
| IgG2                   |                                                        |
| IgG2m4                 | H268Q, V309L, A330S, P331S                             |
| IgG2c4a                | H268A, V309L, A330S, P331S                             |
| IgG2c4b                | V234A, G237A, H268Q, V309L, A330S, P331S               |
| IgG2c4c                | V234A, G237A, H268A, V309L, A330S, P331S               |
| IgG2c4d                | V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S        |
| IgG2c4e                | P233S, V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S |

#### Estudios de afinidades Biacore

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial se realizaron usando un biosensor óptico Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia, actualmente parte de GE Healthcare). Los experimentos se realizaron a 25°C en tampón D-PBS que contenía 3 mM EDTA y 0,01% de tensioactivo P20. Para analizar la interacción de los receptores con mutantes Fc se generó una superficie de captura por acoplamiento covalente de IgG anti-His de ratón (sistemas de I+D cat#MAB050) a un chip sensor CM-5. El anti-His Ab se diluyó en tampón de acetato de sodio 10 mM pH 4,5 (Biacore AB) y se acopló a la superficie de dextrano carboximetilado del chip CM-5 (~3000 RU) usando las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de aminas. Los grupos reactivos restantes en la superficie se desactivaron usando etanolamina-HCl. Para realizar los experimentos cinéticos, se capturaron 165, 351 y 208 unidades de respuesta (RU) de FcγRI, FcγRII y FcγRIII, respectivamente en esta superficie. La captura del receptor fue seguida por la inyección de una dilución en serie de mutantes de tipo silvestre o Fc (de 4000

nM a 3,9 nM en pasos de dilución de 4 veces) a 30 µl/min. La fase de asociación se monitorizó durante 3 minutos. A esto siguió un flujo de tampón durante 20 minutos para monitorizar la disociación de unión. La superficie de captura se regeneró usando un pulso de 9 segundos de ácido fosfórico 100 mM a 100 µL/min seguido por la inyección de tampón de funcionamiento.

Se realizó la resta de referencia doble de los datos para corregir la contribución del tampón al ruido de la señal y del instrumento (Myszka 1999) usando la versión 1,1g del software Scrubber (BioLogic Software) para hacer referencia. Después de este procesamiento inicial de datos, el análisis cinético de los datos se realizó utilizando el software de evaluación BIA, versión 4.0.1 (Biacore, AB) asumiendo un modelo de unión simple 1:1.

#### AlphaScreen y estudios vinculantes

Tanto la competición como la unión directa de IgGs a diversos FcγRs se evaluaron utilizando el ensayo de unión basado en perlas homogéneo, AlphaScreen™ (PerkinElmer, Waltham, MA). En resumen, los experimentos se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Lazar et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103 (11): 4005-10) con modificaciones menores. FcγRI, IIa, se compraron a los sistemas de I+D. FcγRIIIa y FcRn fueron clonados, expresados y purificados. Los mutantes de IgG Fc se ensayaron en unión competitiva contra CNT06234 biotinilado (un anticuerpo de la subclase IgG1 humana no específica de control) o anti-Her2/neu (un anticuerpo de IgG2 humano) que se biotinilaron utilizando la relación NLS-biotina, Pierce, 2:1.

En estudios de unión de competición, se añadieron anticuerpos biotinilados a una concentración de ensayo final de 200 ng/ml, seguido de anticuerpos de ensayo competidores a las concentraciones finales designadas especificadas en cada figura experimental. Se añadieron FcγRs a una concentración final de 200 ng/ml a placas de 96 pocillos, seguido por la adición en serie de perlas de donante de estreptavidina y perlas aceptoras de quelato de Ni. Después de sellar las placas y agitarse a temperatura ambiente, las placas se leyeron utilizando el lector de placas Envision y los datos fueron representados gráficamente y representados en GraphPad Prism. Los estudios de afección se llevaron a cabo de modo similar a los estudios de terminación, con la excepción de que las moléculas de IgG de ensayo se biotinilaron en una relación 2:1 y se evaluó la unión FcR directa en ausencia de competencia frente a un anticuerpo de control.

#### Resultados

Las afinidades relativas de las variantes de IgG para FcRs humanos (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa) evaluadas mediante análisis SPR/Biacore y derivadas de los sensogramas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos de Biacore para la interacción de mutantes Fc con receptores Fc.

| Fc                      | Fcγ RI K <sub>D</sub> (µM) | Fcγ RIIa K <sub>D</sub> (µM) | Fcγ RIIIa K <sub>D</sub> (µM) |
|-------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| hulgG1                  | 0,013*                     | 1,7                          | 0,16*                         |
| hulgG1 - Ag             | 3,7                        | >170                         | > 95                          |
| hulgG4 Ala-Ala, Ser-Pro | 15                         | 150                          | 55                            |
| hulgG2                  | 120                        | 1                            | 41                            |
| hulgG2m4                | 210                        | 2,7                          | 95                            |
| hulgG2c4a               | 160                        | 2,2                          | 85                            |
| hulgG2c4b               | 38                         | 170                          | > 95                          |
| hulgG2c4c               | 0,044*                     | 19                           | 0,64 *                        |
| hulgG2c4d               | >210                       | >170                         | > 95                          |
| hulgG2c4e               | >210                       | >170                         | > 95                          |

Estos números corresponden a los parámetros generados para el ajuste global de un experimento.

Para estos 4 conjuntos de datos, las afinidades se obtuvieron realizando un ajuste usando un ajuste cinético de modelo de unión simple 1:1.

Las afinidades relativas de los mutantes de IgG para FcRs humanos (FcγRIIa, FcγRIIb y FcRn) en un contexto de afección, es decir, para la unión del anticuerpo bivalente a un campo objetivo denso, medida usando ensayos de competición Alpha Screen™ con IgG1 humana (CNT06234) se muestran en las Figuras 3A-C, respectivamente.

Los datos experimentales demostraron que los mutantes de IgG2 así como IgG1 ag e IgG4 Ala/Ala muestran una disminución significativa de la afinidad de unión a los receptores de gamma Fc en comparación con IgG1, manteniendo su capacidad para unirse a FcRn (el receptor Fc neonatal que confiere vida media *in vivo*). Específicamente, en la competición que se une contra IgG2 y en la unión a FcγRIIIa clasificándose desde la afinidad alta a la más baja, la secuencia es la siguiente: IgG1> IgG2c4a> IgG2m4> IgG2 = IgG4c> IgG2c4b> IgG4 ala/ala>

IgG4 agly> IgG2c4d. Esta secuencia es consistente en la competición contra IgG1 (CNT06234) en la unión a FcγRIIb. Un análisis adicional de unión a la competencia contra IgG1 (CNT06234) en la unión a FcRn a pH 6,4 indicó que todos los isotipos y mutantes se unen de forma relativamente igual a FcRn. Es importante destacar que IgG2c4d e IgG1 agly muestran una unión detectable mínima, si existe, a FcγRIIa y FcγRIIb.

## EJEMPLO 2 ADCC Y CDC

CDC se inicia en tres categorías de vías: dependiente de anticuerpos (vía clásica), dependiente de polisacárido (dependiente de lectina) y estructuras superficiales extrañas (vía alternativa), produciendo todas una cascada de pasos proteolíticos que conducen al conjunto de un complejo de ataque de membrana que culmina en la célula diana o en la lisis microbiana (ref W.E. Paul Immunology). Se preparó un subconjunto de isotipos y mutantes Fc descritos en el Ejemplo 1 usando los dominios variables de un anticuerpo anti-CD20 y se evaluó su capacidad para lisar células diana de linfoma de células B WIL2-S en presencia de suero humano. Se utilizó Rituxan® comercialmente disponible, un anti-CD20 terapéutico conocido para mediar CDC de células WIL2-S, que utilizó un control positivo para la lisis. Para el análisis de CDC, se sembraron células diana WIL2-S en una placa de 96 pocillos, se incubaron con complemento de suero humano (dilución 1/6) y se evaluó la viabilidad celular relativa usando AlamarBlue.

El ensayo de ADCC se realizó utilizando el dominio variable anti-HER2/neu combinado con los diversos dominios Fc de los diferentes isotipos o variantes de IgG como se describe en las células de cáncer de mama de Ejemplo 1 y SkBr3 como dianas. Los ensayos se llevaron a cabo como se describió previamente utilizando el método EuTDA de detección de lisis celular (PerkinElmer, Waltham, MA). Las células diana de cáncer de mama SkBr3 cargadas con TDA se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en U, opsonizadas con concentraciones designadas de anticuerpos y co-cultivadas con 25x exceso de PBMC aisladas de leukopacks a 37°C. Después de 3 horas, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron para la liberación de TDA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos crudos se normalizaron y trazaron usando GraphPad Prism. Para el análisis de CDC, las células diana WIL2-S se sembraron a 50.000 por pocillo de una placa de 96 pocillos, se incubaron con complemento de suero humano (dilución 1/6) y la viabilidad celular relativa se evaluó usando AlamarBlue.

## Resultados

ADCC, que principalmente se une con FcγRIIIa en células NK, era indetectable para la serie de construcciones ensayadas que incluían IgG2, IgG2m4, IgG2c4d y e, IgG1 agly e IgG4 ala/ala (Figura 5), consistentes con las características de unión disminuidas mostradas para el receptor de FcγRIIIa (V) de mayor afinidad así como la falta de unión de avidéz en el ensayo AlphaScreen™ (Figura 4A). El uso de dianas de alta densidad, como HER2/neu en células de cáncer de mama como en este estudio, demostró que la afinidad Fc para FcγRIIIa (inferior a 40 μM) parece insuficiente para inducir la lisis de células diana. De forma similar, ninguno de los anticuerpos o mutantes Fc, aparte de IgG1, demostró un nivel significativo de CDC frente a células diana WIL2-S en las construcciones anti-CD20 ensayadas (Figura 6). Entre las subclases de IgG y los mutantes ensayados, sólo IgG1 demostró niveles detectables de CDC, lo que sugiere que independiente de la unión C1q, ninguno de los mutantes restantes pueden desencadenar CDC (Figura 6). Mientras que los esfuerzos previos han señalado que la IgG2 tiene un mínimo de CDC a través de la unión C1q y la activación de la vía clásica, no se observaron niveles significativos de actividad en el contexto anti-CD20, consistente con una observación previa (Idusogie, Presta et al., 2000 J Immunol 164 (8): 4178-84). Además, tampoco se detectaron indicaciones previas de actividad de complemento residual de IgG1 con actividad anti-CD20 y suero humano (Dorai, Mueller y col., 1991 Hybridoma 10 (2): 211-7). Una explicación de esta discrepancia es que mientras que niveles bajos de activación del complemento pueden estar mediados por IgG2, la activación puede ser insuficiente para desencadenar el ensamblaje de un complejo de ataque de membrana (MAC) suficiente para lisar células opsonizadas.

Estos datos sugieren que, independientemente del nivel de activación del complemento, el ensamblaje de complejos de ataque de membrana que culmina en la lisis de células diana es deficiente o insuficiente para anticuerpos de isotipos distintos de la IgG1 unida.

## EJEMPLO 3 FAGOCITOSIS DE CÉLULAS DEPENDIENTES DE ANTICUERPO

Se evaluaron los mutantes Fc de unión anti-HER2/neu para determinar su capacidad para mediar fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), utilizando células de cáncer de mama diana opsonizadas, Sk-Br3 y macrófagos.

### Fagocitosis Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCP)

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica mediante preparaciones estándar de gradiente de densidad de Ficoll-Paque (GE Healthcare) a partir de leukopacks (Biological Specialty Corporation), y las células se dividieron en alícuotas y se almacenaron en nitrógeno. Las PBMCs se descongelaron y las células CD14 positivas se aislaron por agotamiento negativo usando un kit de aislamiento CD14 sin reducción de CD16 (Stem Cell

Technologies) según las instrucciones del fabricante. Las células se plaquearon a  $0,1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en RPMI/5% de FBS/50µg/ml inactivado por calor de gentamicina en presencia de 20 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems) durante 7 días para generar macrófagos derivados de monocitos. Las células tumorales SK-BR-3 se marcaron con PKH67 (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana se lavaron y se incubaron con macrófagos derivados de monocitos a una relación de 1 célula diana a 4 células efectoras en presencia de anticuerpos durante 4 horas a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, las células se separaron con Acutasa (Millipore), y los macrófagos se marcaron con anticuerpos anti-CD11b (BD Biosciences) conjugados con AlexaFluor-647 (Invitrogen). Las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar células tumorales solas (PKH67<sup>pos</sup>, CD11b<sup>neg</sup>), macrófagos solos (PKH67<sup>neg</sup>, CD11b<sup>pos</sup>) y células tumorales fagocitadas (PKH67<sup>pos</sup>, CD11b<sup>pos</sup>). El porcentaje de fagocitosis se determinó mediante la siguiente ecuación: (células tumorales fagocitadas)/(células tumorales fagocitadas más células tumorales solas) x 100%. Las células se adquirieron en un FACS Calibur (Becton Dickinson), y los resultados se analizaron con FloJo Software (Tree Star).

Los monocitos aislados se diferenciaron *in vitro* usando GM-CSF y se caracterizaron además por los niveles de expresión de FcR mediante análisis de citometría de flujo. Como se observó en estudios anteriores por otros, los macrófagos activados con GM-CSF expresaron niveles elevados de todos los FcR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa) con respecto a los monocitos progenitores (datos no mostrados). Las construcciones mutantes Fc anti-HER2/neu IgG fueron posteriormente probadas en ensayos de fagocitosis usando los macrófagos M1.

## Resultados

Después de 4 horas de co-cultivo con células SkBr3 en presencia de cada mAb, se observaron niveles significativos de ADCP para IgG1, pero también se observaron niveles mínimos de ADCP para IgG1, IgG2, IgG2m4 e IgG4 S>P ala/ala aglicosiladas a mayores concentraciones de anticuerpos (Figura 7). Por el contrario, IgG2c4d no demostró niveles detectables de ADCP. Esta observación es consistente con los perfiles de unión anteriormente demostrados de las diversas IgG contra FcRs. Por ejemplo, mientras que IgG1, IgG agly e IgG4 ala/ala demostraron unión usando el múltiplo de ligando mostrando perlas (por ejemplo, utilizando el sistema AlphaScreen®) a FcγRI, los tres también demostraron ADCP. IgG2 e IgG2M4 e IgG4 ala/ala mostraron ADCP mínima a mayores concentraciones. Unión de FcγRIIa por IgG2 e IgG2m4, como se muestra por estudios de avidéz sugiere que la contribución de FcγRIIa puede en sí misma ser insuficiente para conducir niveles significativos de ADCP. Los resultados BiaCore y AlphaScreen™ (Tabla 5 y Figuras 4B y 4C) indicaron además que mientras que IgG agly ha retenido la unión a FcγRI, IgG4 ala/ala muestra avidéz tanto para FcγRI como para FcγRIIa, sin embargo, ADCP es comparativamente más robusto para IgG1 agly que IgG4 ala/ala. Ya que IgG1 agly tiene unión mínima, si existe, a FcγRIIa y por extensión a FcγRIIb muy similar inhibidor (basado en la identidad de la secuencia > 95% en el dominio extracelular) la activación de ITAMs a través de señalización FcγRI no es contrarrestada por la señalización a través de ITIMs asociados con activación de FcγRIIb. Por el contrario, IgG4 S>P ala/ala muestra una fagocitosis humedecida, probablemente debido a la activación de FcγRIIb. Finalmente, la ausencia total de unión monomérica o de avidéz detectable de IgG2c4d a diversos FcRs da soporte además a la capacidad fagocitótica única abolida de este esqueleto de Fc.

## EJEMPLO 4: LIBERACIÓN DE CITOCINA MEDICADA POR ANTICUERPOS

El acoplamiento Fc de FcR sobre células inmunitarias promueve la liberación de citoquinas cuando se reticula. Con el fin de imitar el compromiso basado en la avidéz de FcRs en células inmunitarias, los mAbs se unieron a perlas de poliestireno.

La liberación de citoquinas usando mutantes anti-HER2/neu IgG se realizó después de la unión directa de IgGs a perlas de látex después de una incubación durante la noche. Las perlas lavadas se añadieron a PBMC humanas aisladas a diversas concentraciones como se especifica de aproximadamente 1500 a 250.000 por ml y se incubaron durante la noche antes de retirar el sobrenadante de co-cultivo para medir el TNFα secretado utilizando el kit estándar AlphaELISA de PerkinElmer.

Los isotipos IgG testados y los mutantes Fc poseen capacidad diferencial para estimular la liberación de citoquinas a través de la secreción de TNFα mediada por receptores Fc a partir de PBMC (Figura 8). Por consiguiente, los niveles de secreción de TNF por diversos isotipos y sus mutantes Fc de alto a bajo, son los siguientes: IgG1> IgG2> IgG2m4> IgG2c4a> IgG1agly> IgG4ala/ala> IgG2c4b> IgG2c4c> IgG4c4d y e. Es de remarcar que ambos mutantes de IgG4d y de e Fc poseen capacidad mínima, si existe, para inducir la liberación detectable de la citoquina (TNF).

## EJEMPLO 5 EXPLECIÓN DE CÉLULAS B *ex vivo*

Para comprender mejor la capacidad de los isotipos y mutantes en su nivel de silenciamiento *in vivo*, se determinó la depleción *ex vivo* de células B de WIL2-S en presencia de sangre humana completa heparinizada. Como se sabe que una IgG1 anti-CD20 engloba todas las funciones efectoras (ADCC, CDC, ADCP), todo el sistema sanguíneo, incluyendo la presencia de PMNs (neutrófilos, basófilos, etc.), complemento humano y exceso de IgG se

consideraron representativos del nivel de "silencio" conferido por cada variante.

Brevemente, la sangre humana entera proporcionó las células efectoras y las células WIL2-S sirvieron como células diana para los ensayos de ADCC. Las células diana se pre-etiquetaron con BATDA (PerkinElmer) durante 30 minutos a 37°C, se lavaron dos veces y se resuspendieron en DMEM/5% de FBS inactivado por calor, después se añadieron 50 µl de diana ( $2 \times 10^4$  células por pocillo) a los pocillos de placas de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl adicionales con o sin anticuerpos de diversas concentraciones, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió sangre humana entera (100 µl) a los pocillos. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 3 minutos, se incubaron a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 horas y después se centrifugaron de nuevo a 200 g durante 3 minutos. Se eliminó un total de 20 µl de sobrenadante por pocillo y se midió la lisis celular mediante la adición de 200 µl del reactivo a base de euriopio DELPHIA (PerkinElmer). La fluorescencia se midió usando un Lector Multilabel Envision 2101 (PerkinElmer). Los datos se normalizaron a la citotoxicidad máxima obtenida tratando células con Triton X-100 (Sigma Aldrich) y control mínimo determinado por la liberación espontánea de BATDA de células diana solamente. Los datos se ajustaron a un modelo dosis-respuesta sigmoidal utilizando GraphPad Prism v5.01.

El co-cultivo de WIL2-S en presencia de sangre humana reveló un agotamiento mediado por efector severo de WIL2-S etiquetado usando IgG1 y hasta cierto punto por IgG2 e IgG2M4. Debe tenerse en cuenta que los fragmentos (Fab')<sub>2</sub> y Fab anti-CD20 indujeron un cierto nivel de depleción de WIL2-S que puede indicar la presencia de un autoanticuerpo IgG escindido en el suero (véase, por ejemplo, Breski et al., 2008, J Immunol 181: 3183- 3192) capaces de restablecer la función efectora. De forma consistente con los datos anteriores de ADCC, CDC y ADCP, no se observaron niveles significativos o detectables de liberación de citoquinas con IgG2c4e.

#### **EJEMPLO 6: SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS B *in vivo* CON FOCALIZACIÓN DE CD20**

Se evaluó la función efectora *in vivo* asociada con IgG2c4e utilizando un modelo de depleción de células B Cynomolgus establecido de anti-CD20 (Reff et al, 1994, Blood 83: 435-445).

Se inyectaron monos Cynomolgus (n = 3/grupo) con solución salina 7 días antes de las dosis intravenosas de un solo bolo de IgG1 o IgG2 Σ a 0,2 mg/Kg o 2 mg/Kg. En los días designados después de las inyecciones, los niveles de células B de muestras de sangre completa se determinaron mediante análisis de citometría de flujo de células B y T utilizando anticuerpos anti-CD20 y anti-CD3 como marcadores, respectivamente. Los niveles medios de células B (CD20 +/CD3-) para cada grupo se representaron gráficamente durante tres semanas después de la inyección (Figura 9). Mientras que las dosis bajas de IgG1 (0,2 mg/kg) indujeron el agotamiento casi completo de todas las células B 1 día después de la inyección (99%), no se indujo una depleción significativa por IgG2c4e anti-CD20 (promedio del 15% dentro del grupo). Los niveles de células B permanecieron relativamente normales para los animales tratados con IgG2c4e anti-CD20 durante los días subsiguientes y hubo una tendencia gradual hacia la recuperación de los niveles de células B observados para monos tratados con IgG1 durante las semanas subsiguientes. Es de remarcar que tanto IgG2c4e como IgG1 indujeron un agotamiento casi completo de las células B a la dosis más alta de 2 mg/Kg.

Se cree que la depleción de células B mediada por anti-CD20 está mediada por varios mecanismos, incluyendo ADCC, CDC y apoptosis. En vista de los datos de agotamiento de células B de mono que indican el agotamiento de las células B a la dosis más alta (2 mg/Kg) por IgG2c4e, la base mecanicista del agotamiento de las células B se evaluó adicionalmente midiendo los niveles de apoptosis inducidos por los anticuerpos en Células B aisladas.

Se trataron células B aisladas con concentraciones de IgG1, IgG2c4e, (Fab')<sub>2</sub> e IgG2 de 0, 0,26, 2,6 y 26 mg/ml, así como un mAb de control no vinculante (BM21) durante 4 horas y Anexina V positiva, células negativas 7AAD fueron cuantificadas por citometría de flujo. Se seleccionaron concentraciones finales específicas de 2,6 y 26 mg/ml para reflejar las concentraciones máximas estimadas *in vivo* de IgG en suero después de inyecciones en bolo de 0,2 y 2 mg/Kg.

Para todos los tres anticuerpos de unión, se observó una inducción de apoptosis dependiente de la dosis para todas las IgG, incluyendo (Fab')<sub>2</sub>, lo que indica que la reticulación mediada por anti-CD20 es suficiente para la inducción de muerte celular en la dosis más alta, pero no la dosis más baja para IgG2c4e. Es de remarcar que (Fab')<sub>2</sub> también demostró una apoptosis significativa en ausencia de un Fc, lo que confirma la noción de que la apoptosis mediada por anti-IgG puede inducirse independientemente de la reticulación mediada por Fc como se ha observado anteriormente.

De este modo, las funciones normales asociadas con la reticulación del antígeno diana sobre las células no se eliminan mediante la variante de Fc modificada

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> Mutantes Fc del anticuerpo con funciones efectoras ablacionadas

5 <130> P069161EP

<150> 61/265,079

<151> 2009-11-30

10 <160> 6

<170> FastSEQ para versión Windows 4.0

15 <210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CARACTERISTICA MISCELANEA

<222> (1)..(1)

<223> Bisagra comienzo, residuo EU 218

25 <220>

<221> MUTAGENO

<222> (13)..(17)

<223> PVAGP, PAAAP, PAAAS, and SAAAS

30 <220>

<221> MUTAGENO

<222> (47)..(47)

<223> Puede ser H (wt), Q, o A

35 <220>

<221> MUTAGENO

<222> (88)..(88)

<223> Puede ser V (wt) o L

40 <220>

<221> MUTAGENO

<222> (109)..(110)

<223> Puede ser AP (wt) o SS

45 <400> 1

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Lys | Cys | Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Xaa | Xaa | Ala | Xaa |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|    | Xaa | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| 50 | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Xaa | Glu |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
|    | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| 55 | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe | Arg |
|    | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
|    | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Xaa | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |
|    |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

60

65

5           Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Xaa Xaa Ile Glu  
                                   100                                  105                                  110  
           Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
                                   115                                  120                                  125  
           Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
                                   130                                  135                                  140  
           Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
                                   145                                  150                                  155                                  160  
           Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met  
                                   165                                  170                                  175  
           Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
                                   180                                  185                                  190  
           Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
                                   195                                  200                                  205  
           Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                                   210                                  215                                  220  
           Gly Lys  
           225

20

<210> 2  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 2

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

60

<210> 3  
 <211> 230  
 <212> PRT

65

# ES 2 751 549 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

40 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> residuos humanos IgG y mutaciones

<400> 4

|    |  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |
|----|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50 |  |  |  |  |  | Pro | Ala | Ala | Ala | Pro |
|    |  |  |  |  |  | 1   |     |     |     | 5   |

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> residuos humanos IgG y mutaciones

60 <400> 5

|  |  |  |  |  |     |     |     |     |     |
|--|--|--|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|
|  |  |  |  |  | Pro | Ala | Ala | Ala | Ser |
|  |  |  |  |  | 1   |     |     |     | 5   |

65 <210> 6

## ES 2 751 549 T3

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> residuos humanos IgG y mutaciones

<400> 6

10                      Ser Ala Ala Ala Ser  
                         1                      5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula que contiene Fc que tiene una afinidad disminuida por al menos un receptor de Fcγ en comparación con un Fc de tipo salvaje, que comprende un dominio Fc de anticuerpo con una región constante de IgG mutada, en donde los residuos de aminoácidos 234, 235 y 237 definidos por el sistema de numeración EU comprenden AAA, y en donde el dominio Fc comprende además:

- (a) las mutaciones H268A, A330S y P331S definidas por el sistema de numeración EU, o
- (b) las mutaciones H268A o H268Q, V309L, A330S y P331S como se define por el sistema de numeración EU.

2. La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que el dominio es capaz de unirse específicamente a FcRn.

3. La molécula que contiene Fc de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia del dominio Fc tiene por lo menos un 90% de identidad con un dominio de CH2 de cadena pesada de IgG humana.

4. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que al menos un FcγR es FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa o FcγRIIIb

5. La molécula que contiene Fc de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula que contiene Fc es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fc.

6. Una molécula de unión basada en polipéptido recombinante que comprende: (i) un dominio de unión capaz de unirse a una molécula objetivo, y (ii) un dominio Fc que tiene una secuencia de aminoácidos homóloga a todo o parte de un dominio constante de CH2 y CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina humana y en donde los residuos 234, 235 y 237 definidos por el sistema de numeración EU comprenden AAA; en donde la molécula de unión es capaz de unirse a la molécula objetivo sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa, o la destrucción mediada por células del objetivo, y en donde el dominio Fc comprende además:

- (a) las mutaciones H268A, A330S y P331S definidas por el sistema de numeración EU, o
- (b) las mutaciones H268A o H268Q, V309L, A330S y P331S como se define por el sistema de numeración EU.

7. La molécula de unión de la reivindicación 6, en la que el dominio Fc es capaz de unirse específicamente a FcRn.

8. La molécula de unión de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que el dominio de unión se selecciona del sitio de unión de un anticuerpo; una enzima; una hormona; un receptor; una citoquina; un antígeno de superficie celular inmune; un ligando y una molécula de adhesión, en donde la molécula muestra opcionalmente afección.

9. La molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que el dominio de unión se une específicamente a un objetivo dentro de un tejido neurológico, un tejido endocrino, un tejido vascular, un tejido cardíaco, un tejido sinovial, un tejido dérmico o un tejido mucoso.

10. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que contiene Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o la molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9.

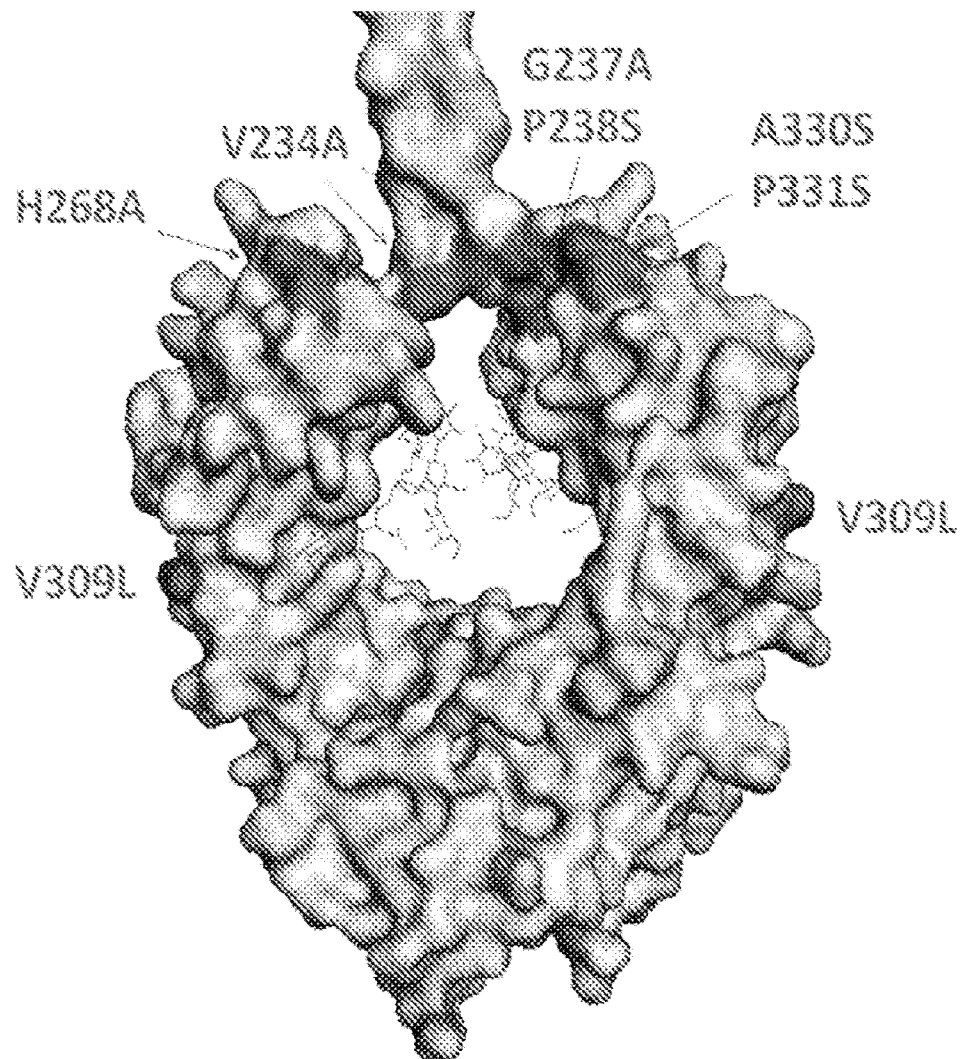
11. La molécula que contiene Fc de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en terapia.

12. La molécula que contiene Fc o la molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o la molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar la enfermedad de injerto contra huésped; enfermedad de huésped contra injerto; rechazo de trasplante de órgano; rechazo de trasplante de médula ósea; autoinmunidad, vasculitis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune y artritis; aloinmunidad como trombocitopenia aloinmune fetal/neonatal; asma y alergia; enfermedades inflamatorias crónicas o agudas, enfermedad de Crohn o esclerodermia; enfermedad de Alzheimer u, oclusión de la arteria coronaria.

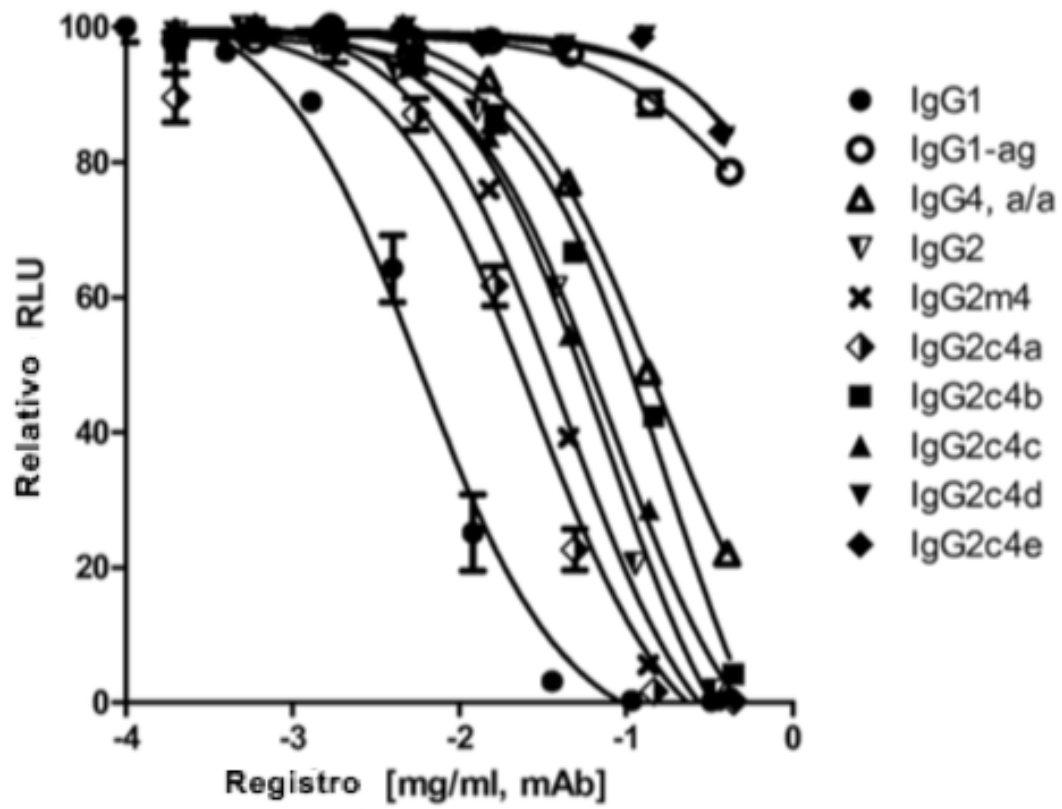
*Fig. 1*

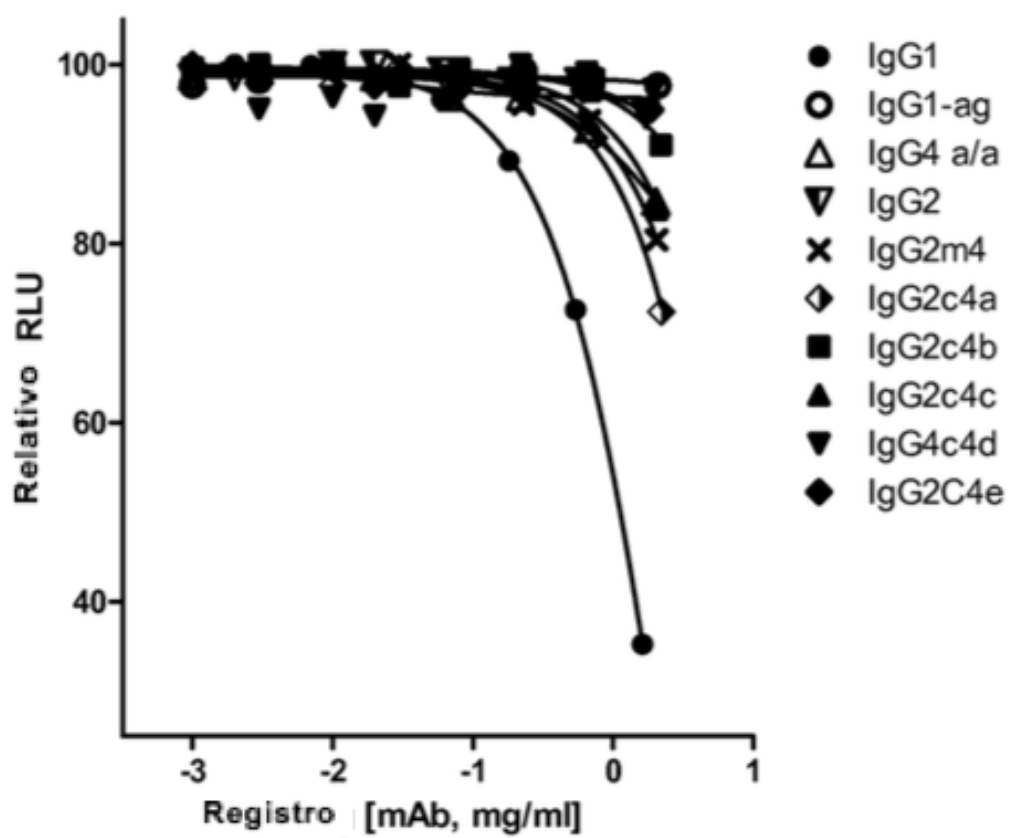
|       |                                |                           |                                          |
|-------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------------|
|       | 218                            |                           | 267                                      |
| hIgG2 | KCC---                         | VECP                      | PCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS |
| hIgG4 | KYG---                         | PPCP                      | SPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS |
| hIgG1 | KSCDKTHTCP                     | PCPAP                     | ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS      |
|       | *                              | ** ****                   | *****                                    |
|       | 268                            |                           | 317                                      |
| hIgG2 | HEDPEVQFNWYVDG                 | VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS   | SVLTVVHQDWLNGK                           |
| hIgG4 | QEDPEVQFNWYVDG                 | VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS   | SVLTVLHQDWLNGK                           |
| hIgG1 | HEDPEVKFNWYVDG                 | VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS   | SVLTVLHQDWLNGK                           |
|       | *****                          | *****                     | *** *****                                |
|       | 318                            |                           | 367                                      |
| hIgG2 | EYKCKVSNKGLPAPI                | EKTISKTKGQPREPQVYTLPPS    | SREEMTKNQVSLTC                           |
| hIgG4 | EYKCKVSNKGLPSS                 | IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS   | QEEMTKNQVSLTC                            |
| hIgG1 | EYKCKVSNKALPAPI                | EKTISKAKGQPREPQVYTLPPS    | RDELTKNQVSLTC                            |
|       | *****                          | ** *****                  | * *****                                  |
|       | 368                            |                           | 417                                      |
| hIgG2 | LVKGFYPSDIAVEWESNGQ            | PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT | VDKSRW                                   |
| hIgG4 | LVKGFYPSDIAVEWESNGQ            | PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT | VDKSRW                                   |
| hIgG1 | LVKGFYPSDIAVEWESNGQ            | PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT | VDKSRW                                   |
|       | *****                          | *****                     | *****                                    |
|       | 418                            |                           | 447                                      |
| hIgG2 | QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |                           |                                          |
| hIgG4 | QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |                           |                                          |
| hIgG1 | QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |                           |                                          |
|       | * *****                        |                           | **                                       |

*Fig. 2*

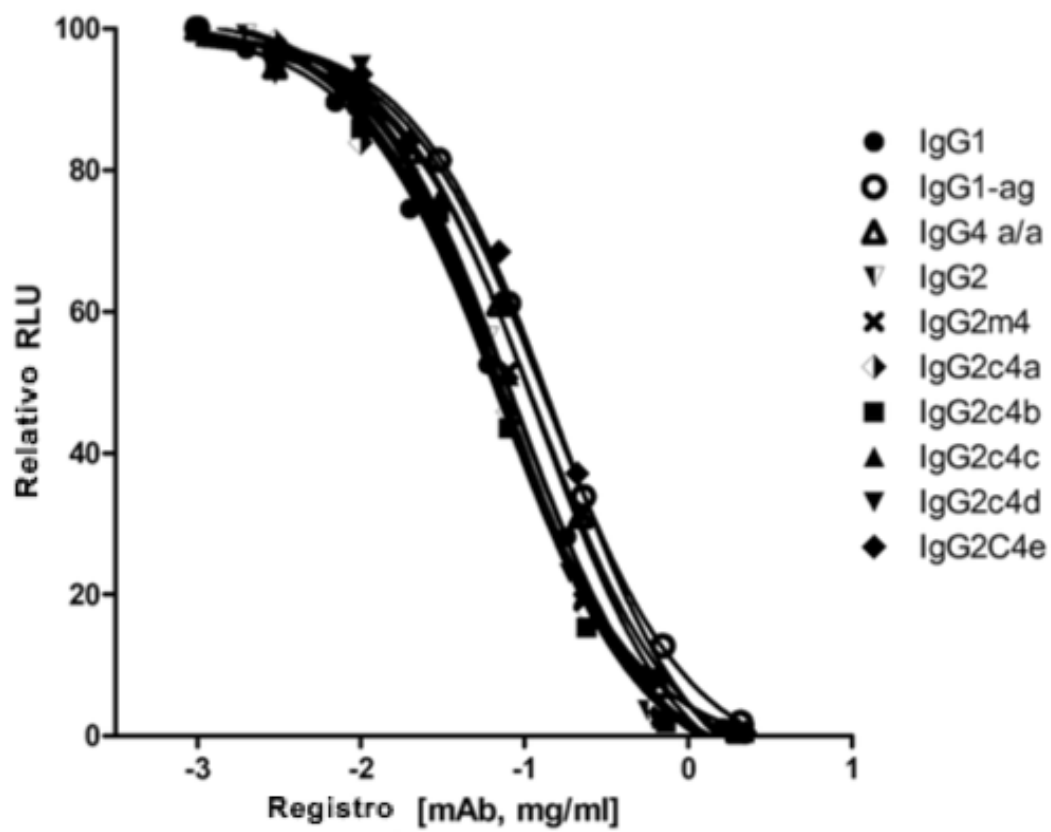


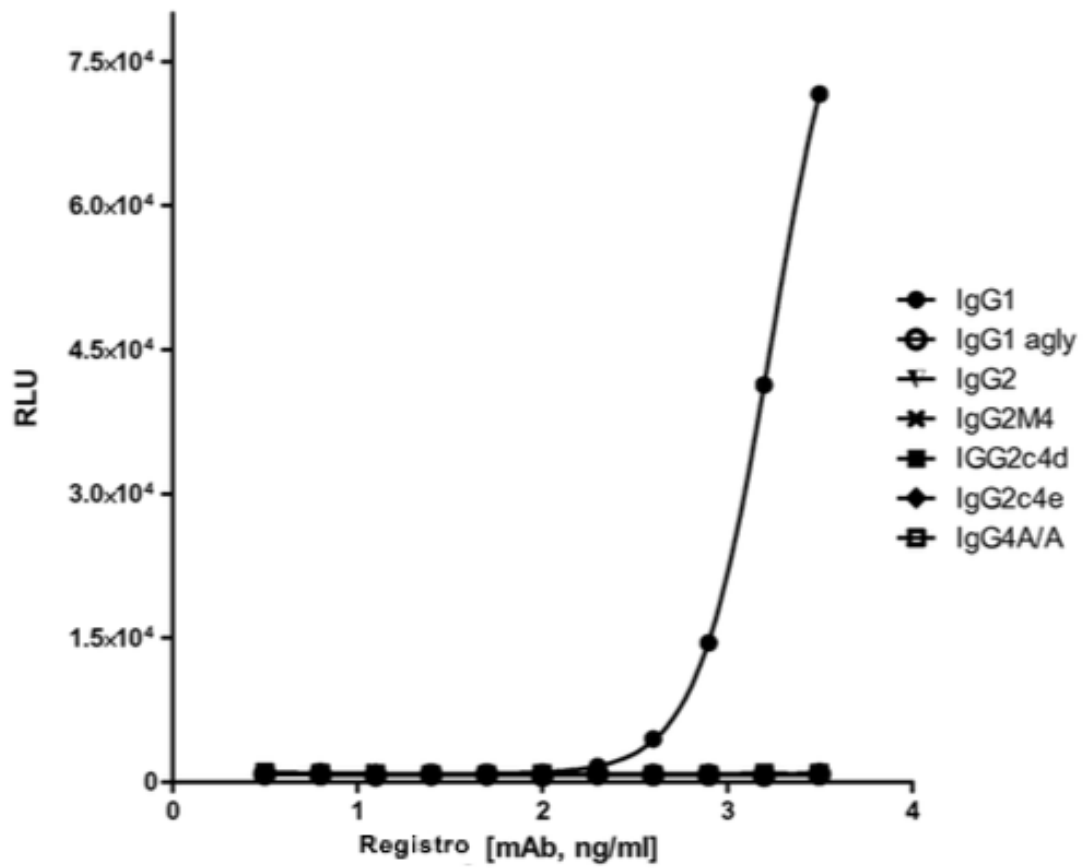
*Fig. 3A*

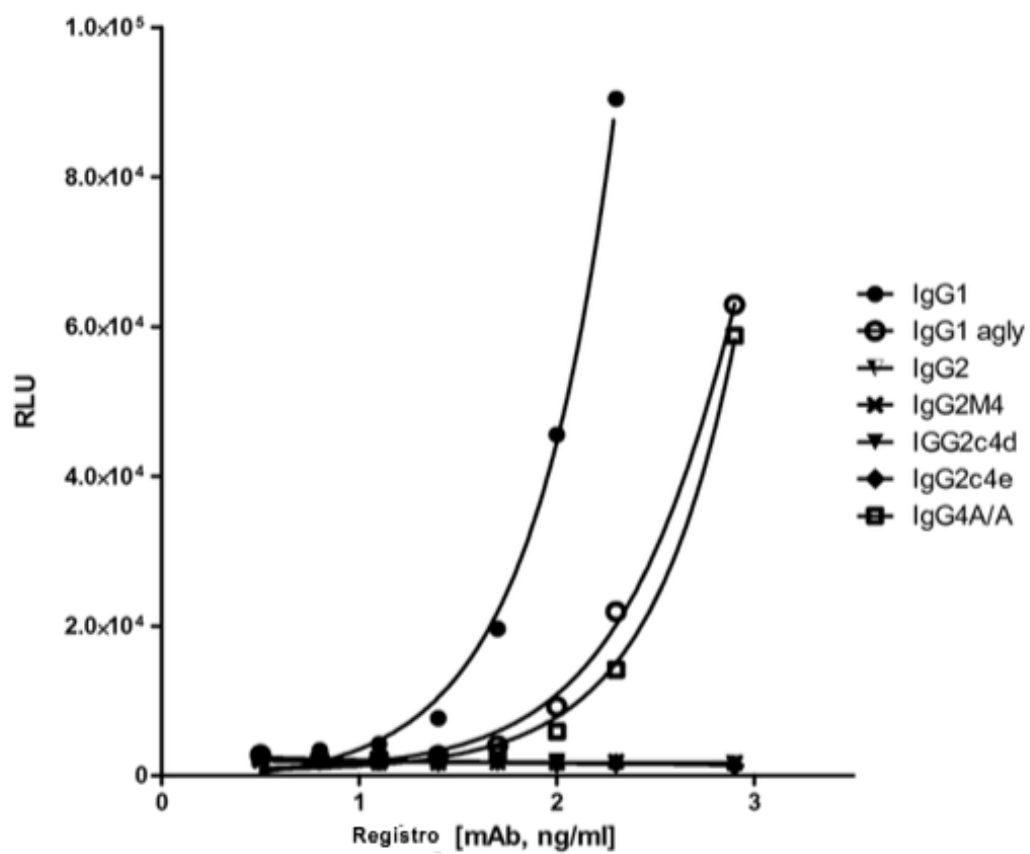


*Fig. 3B*

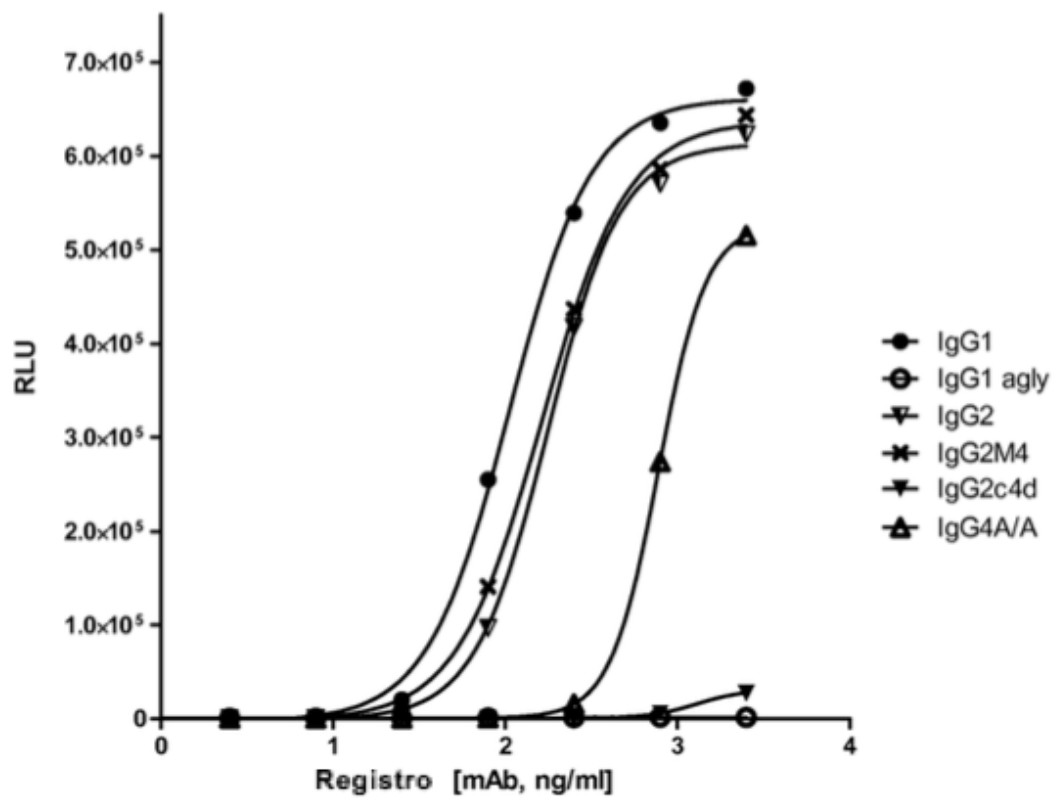
*Fig. 3C*



*Fig. 4A*

*Fig. 4B*

*Fig. 4C*



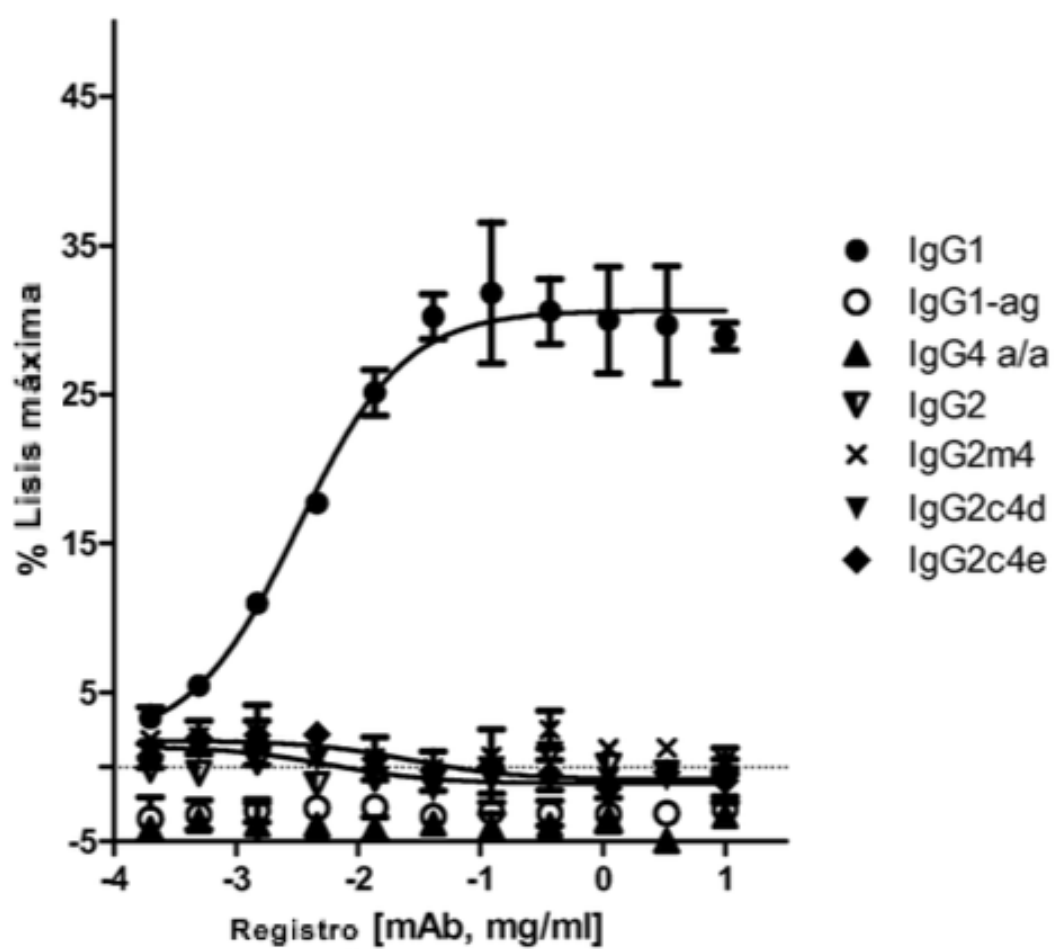
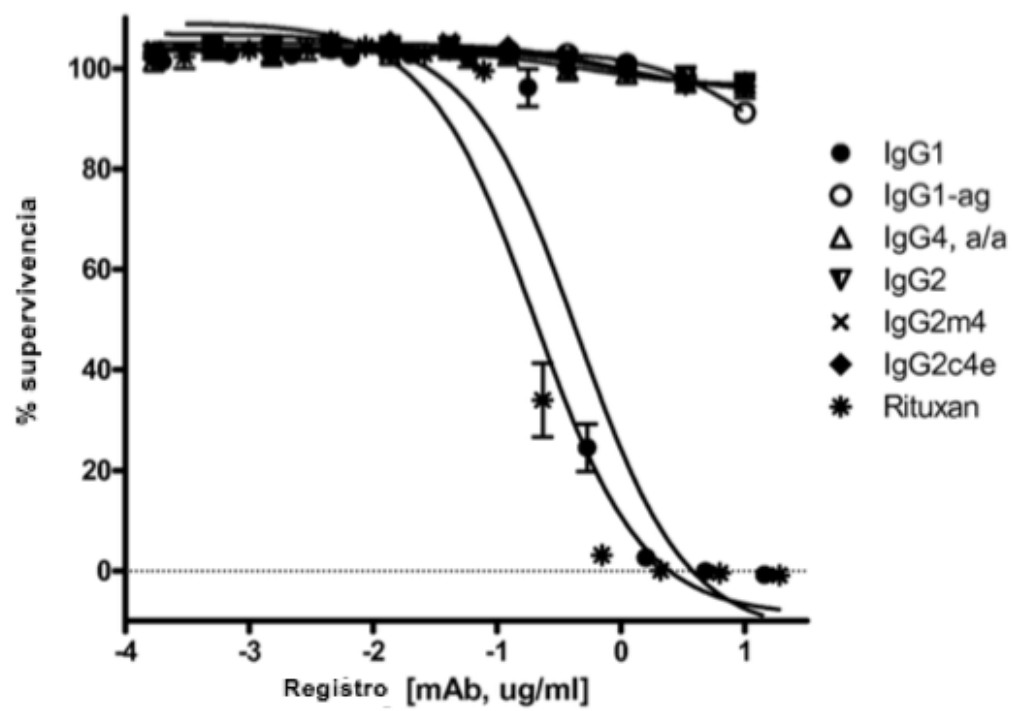
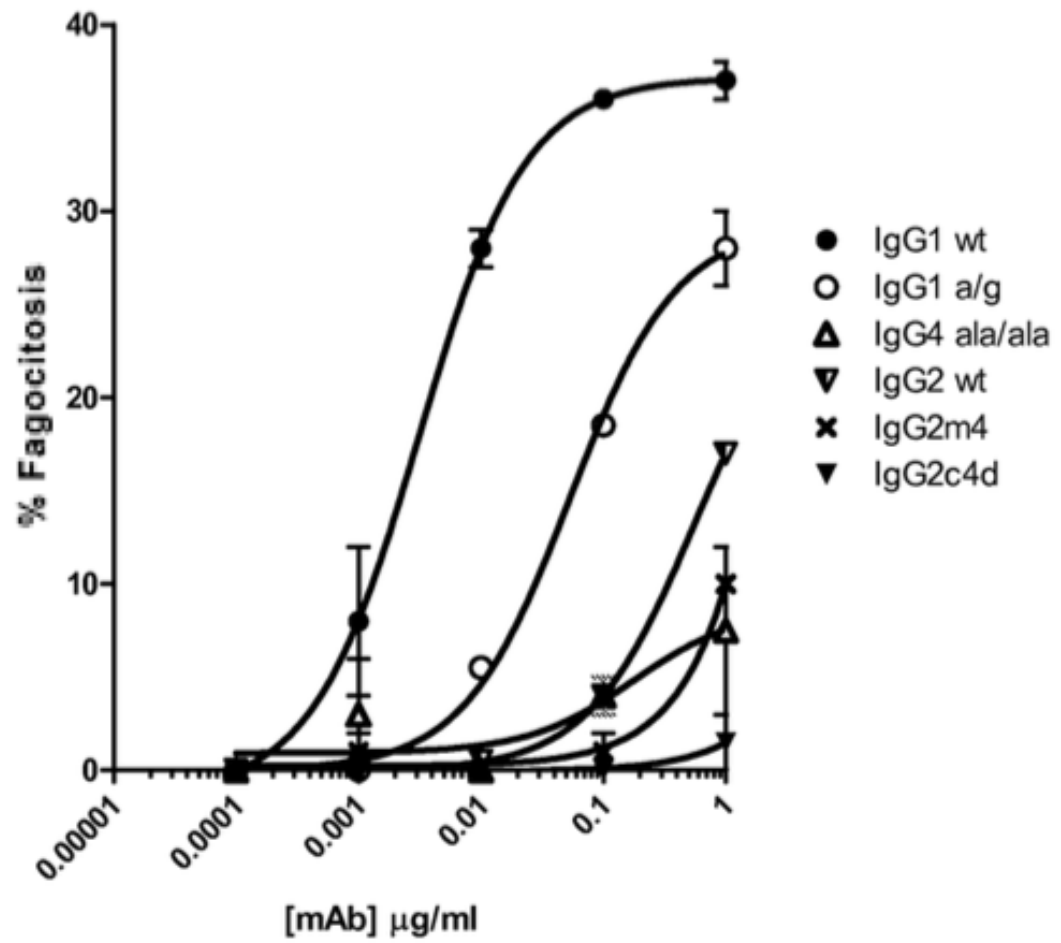
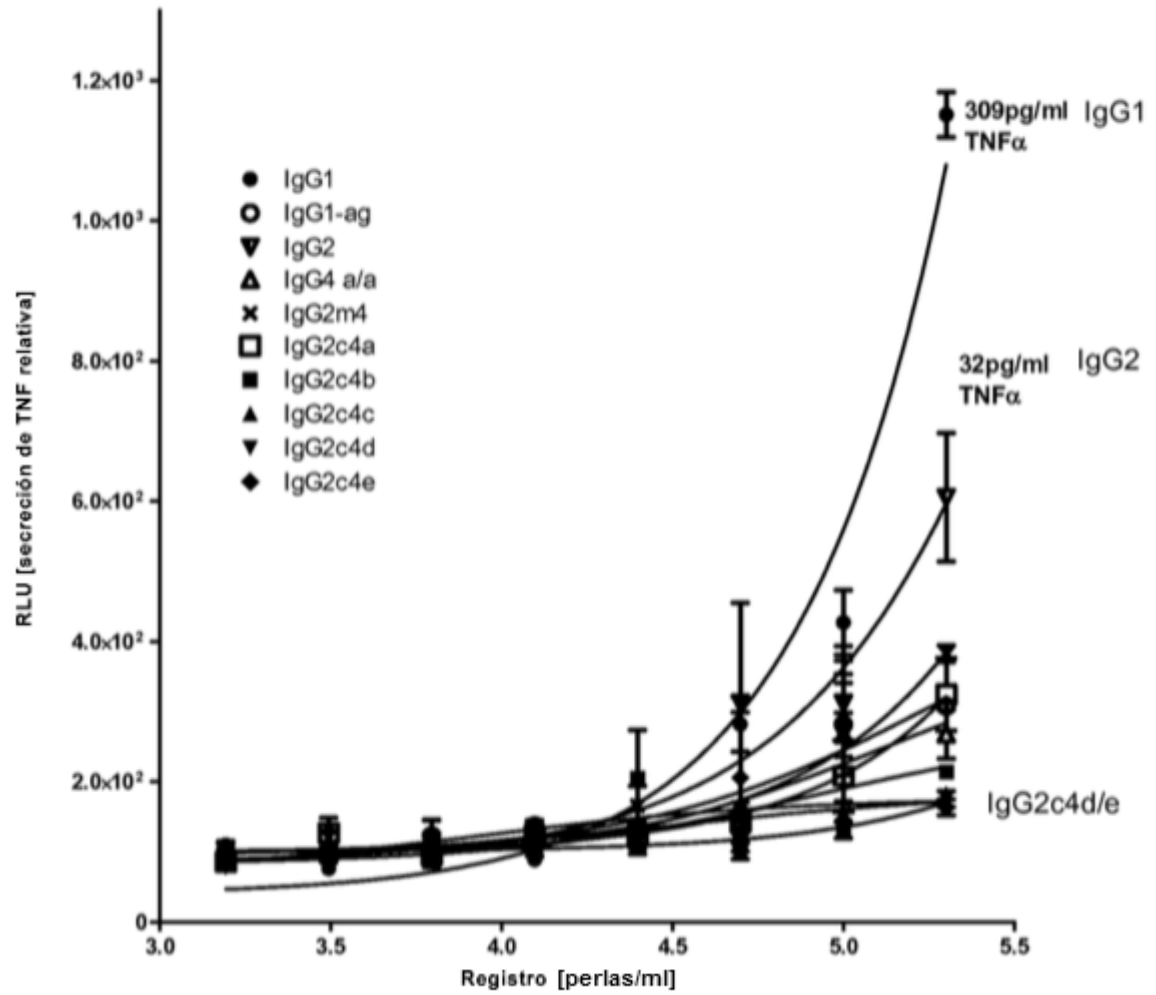
*Fig. 5*

Fig. 6



*Fig. 7*

*Fig. 8*



*Fig. 9*

