

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 345**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013** **PCT/EP2013/050429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014** **WO14108198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013** **E 13700218 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 2943506**

54 Título: **Variantes de la región FC de IGG1 humana y usos de las mismas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

GENMAB B.V. (100.0%)
Uppsalalaan 15
3584 CT Utrecht, NL

72 Inventor/es:

PARREN, PAUL;
BEURSKENS, FRANK;
DE JONG, ROB, N.;
VERPLOEGEN, SANDRA;
LABRIJN, ARAN, FRANK y
SCHUURMAN, JANINE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 984 345 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de la región FC de IGG1 humana y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo y también puede tener otras funciones efectoras modificadas resultantes de una o más modificaciones de aminoácidos en el dominio Fc.

Antecedentes de la invención

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

15 Cada anticuerpo IgG contiene dos sitios de unión para C1q, uno en cada región constante de la cadena pesada (Fc). Sin embargo, una sola molécula de IgG en solución no activa el complemento, ya que la afinidad de la IgG monomérica por el C1q es bastante débil ($K_d \sim 10^{-4}$ M) (Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem. 248,2818-13; Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol. 16,697-701). La asociación de IgG impulsada por el antígeno puede conducir a una unión mucho más estrecha de la molécula multivalente C1q ($K_d \sim 10^{-8}$ M) y a la activación del complemento (Burton et al., 1990 Mol. Immunol. 22, 161-206). Por el contrario, la IgM existe de forma natural en pentámeros o hexámeros unidos covalentemente, y al unirse a un antígeno expresado o inmovilizado celular, los pentámeros y hexámeros de IgM 20 pueden provocar de forma eficaz la CDC. La unión al antígeno es un requisito para inducir un cambio conformacional en la IgM para exponer los sitios de unión C1q (Feinstein et al., 1986, Immunology Today, 169-174).

25 Se ha sugerido que también la IgG puede lograr la activación del complemento mediante la formación de estructuras hexaméricas en anillo, a través de la interacción de los dominios CH2/CH3 de la región Fc (Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69). Se han encontrado pruebas que apoyan la existencia de tales estructuras hexaméricas de IgG en dos dimensiones (Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4th edit. (Weir, D. M. ed.), pp17.1-17.5. Blackwell, Edinburgh; Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5) y cristales tridimensionales, así como para IgG1, IgG2a e IgG4 y Fc humano en solución (Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115). También se observó la formación de un anillo hexamérico en la estructura cristalina del anticuerpo IgG1 κ humano b12 dirigido 30 contra la gp120 del VIH-1 (1HZH en PDB) (Saphire et al., Science 2001 Aug 10;293(5532),1155-9). En el anillo hexámero b12, se presentaban seis sitios de unión C1q accesibles en la superficie del hexámero, uno de cada uno de los seis anticuerpos, mientras que los otros seis sitios de unión miraban hacia abajo.

35 C1q se parece a un manojo de tulipanes con seis cabezas globulares, que contienen las regiones de combinación de anticuerpos, unidas a seis tallos colágenos (Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26; Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77; Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12; Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81). Se encontró que C1q encajaba en el ensamblaje hexamérico b12 de la estructura cristalina de 1HZH, de modo que cada una de las seis cabezas globulares estaba en contacto con uno de los seis sitios de unión a C1q (Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5-10 July 2010; "Crystal Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Thesis by Erica Ollmann Saphire, for the Scripps Research Institute, La Jolla, California. Noviembre de 2000). Se observó que las mutaciones en aminoácidos seleccionados en las interfaces Fc 40 observadas entre anticuerpos b12 relacionados por simetría en la estructura cristalina disminuían la avidez de unión a C1q, lo que indica la contribución de estos aminoácidos a la interacción intermolecular Fc:Fc.

El documento WO 2006/104989 describe regiones Fc de anticuerpos alteradas y usos de las mismas.

45 El documento WO 2005/047327 describe variantes polipeptídicas de unión al receptor Fc neonatal (FcRn), proteínas de unión a Fc diméricas y métodos relacionados con las mismas.

El documento WO 2010/106180 describe variantes de Fc que tienen una mayor unión al receptor Fc neonatal (FcRn).

El documento WO 2005/070963 describe variantes de la región Fc del polipéptido y usos de las mismas.

El documento WO 2006/053301 describe variantes de Fc con unión alterada a FcRn.

50 El documento US 2011/0123440 describe regiones Fc de anticuerpos alteradas y sus usos. Las regiones Fc alteradas tienen una o más sustituciones de aminoácidos.

El documento US 2008/0089892 describe variantes de la región Fc de polipéptidos y composiciones que comprenden estas variantes de la región Fc.

El documento US 2010/0184959 describe métodos para proporcionar una variante del polipéptido Fc con reconocimiento alterado de un ligando Fc y/o función efectora.

El documento US 2010/015133 describe métodos de producción de polipéptidos mediante la regulación de la asociación de polipéptidos.

- 5 El documento US 2010/105873 describe un enfoque integrado para generar terapias proteicas multidominio.

El documento US 6,737,056 describe variantes polipeptídicas con función efectora alterada.

- 10 Se han realizado esfuerzos previos para identificar variantes Fc de anticuerpos con una función efectora mejorada u otras propiedades modificadas. Tales estudios se han centrado, por ejemplo, en el intercambio de segmentos entre isotipos de IgG para generar moléculas de IgG quiméricas (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72) o sustituciones de aminoácidos en la región bisagra (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138) o en o cerca del sitio de unión a C1q en el dominio CH2, centrado alrededor de los residuos D270, K322, P329 y P331 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564 y WO 99/51642) Por ejemplo, Moore et al. (2010 mAbs 2(2), 181-189)) describen el ensayo de varias combinaciones de S267E, H268F, S324T, S239D, I332E, G236A e I332E para mejorar la función efectora mediante CDC o ADCC. También se han sugerido otras mutaciones Fc que afectan a la unión a los receptores Fc (WO 2006/105062, WO 00/42072, Patente U.S. 6.737.056 y Patente U.S. 7.083.784) o a las propiedades físicas de los anticuerpos (WO 2007/005612 A1).

El documento WO 2006/021114 describe un método para aumentar la capacidad de los anticuerpos para mediar en la CDC mediante la introducción de ciertas mutaciones en la región Fc.

- 20 El documento WO 2013/004842 describe un método para aumentar la capacidad de los anticuerpos para mediar la CDC mediante la introducción de ciertas mutaciones en la región Fc.

Sin embargo, a pesar de estos y otros avances en la técnica, sigue existiendo la necesidad de nuevas y mejores terapias basadas en anticuerpos.

Resumen de la invención

- 25 La presente invención proporciona un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo, sin alterar la activación del complemento en fase fluida independiente de la diana de un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión. El polipéptido/anticuerpo también puede tener otras funciones efectoras mejoradas en comparación con su polipéptido/anticuerpo progenitor. Sin limitarse a la teoría, se cree que las variantes son capaces de una interacción de unión más estable entre las regiones Fc de dos moléculas de polipéptido/anticuerpo, proporcionando así una superficie más ávida que conduce a una función efectora mejorada, como una respuesta CDC aumentada o más específica. Las variantes particulares también se caracterizan por una respuesta ADCC mejorada, una respuesta ADCP y/u otras funciones efectoras mejoradas. Este sutil mecanismo de ingeniería de polipéptidos/anticuerpos puede aplicarse, por ejemplo, para aumentar la eficacia o especificidad de terapias basadas en anticuerpos, como se describe en el presente documento.

- 35 Así, en un aspecto la presente invención se refiere a un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo, sin alterar la activación del complemento independiente de la diana en fase fluida de un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, dicho método comprende introducir una mutación en el anticuerpo progenitor en un residuo de aminoácido correspondiente a E430G o E430S en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, evaluar la respuesta CDC inducida por el anticuerpo variante cuando se une a la superficie de una célula que expresa antígeno en presencia de células efectoras o complemento en comparación con el anticuerpo progenitor; evaluar la actividad del complemento en fase fluida independiente de la diana del anticuerpo variante en comparación con el anticuerpo progenitor incubando el anticuerpo en suero humano normal y determinando la generación de C4d en comparación con el anticuerpo progenitor; y seleccionar un anticuerpo variante que tenga una respuesta CDC aumentada y una activación del complemento en fase independiente de la diana inalterada.

- 45 También se divulga en el presente documento una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la unión de la variante al receptor Fc neonatal (FcRn).

- 50 La invención también prevé el uso de una o más de dichas mutaciones para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo mediada por el polipéptido o anticuerpo cuando se une a su antígeno en, por ejemplo, la superficie de una célula que expresa el antígeno, una membrana celular o un virión.

En un aspecto, denominado en el presente documento "mutante simple", la variante tiene una CDC aumentada y también puede tener otras funciones efectoras aumentadas en comparación con el polipéptido o anticuerpo progenitor.

En un aspecto, denominado en el presente documento "mutante doble", la variante comprende al menos dos mutaciones en dicho segmento, y tiene una CDC mejorada y también puede tener otras funciones efectoras mejoradas en comparación con una variante que comprende solo una de dichas al menos dos mutaciones.

5 En un aspecto, denominado en el presente documento "mutante mixta", la variante proporciona una CDC aumentada y también puede tener otras funciones efectoras aumentadas cuando se utiliza en combinación con una segunda variante del mismo polipéptido o anticuerpo, o de uno diferente, que comprende una mutación en un residuo de aminoácidos diferente en dicho segmento, en comparación con una o más de la variante, la segunda variante y el polipéptido o anticuerpo progenitor solos.

10 Típicamente, la mutación es una sustitución de aminoácidos, tal como una mutación que intercambia un residuo de aminoácidos progenitor por uno que tiene un tamaño y/o propiedad fisicoquímica diferente que promueve la formación de un nuevo enlace intermolecular Fc:Fc o aumenta la fuerza de interacción de un par existente. En las Tablas 1 y 2A y B se muestran residuos de aminoácidos de ejemplo para mutación de acuerdo con la invención, junto con sustituciones de aminoácidos de ejemplo. En la Figura 1 se proporcionan ilustraciones no limitativas de diferentes aspectos de la invención.

15 También se describen con más detalle a continuación diversos usos y aplicaciones terapéuticas del polipéptido y las variantes de anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: (A) Representación esquemática de las moléculas de IgG en formación de hexámeros. El círculo punteado ilustra dos pares de interacción Fc:Fc adyacentes de dos moléculas IgG vecinas. La flecha del recuadro ilustra la dirección desde la que se ven las ilustraciones en B, C y D: las dos moléculas Fc vecinas están giradas 90° (en el plano del dibujo) y vistas desde los brazos Fab en la dirección de los dominios CH3. (B) Efecto observado de las mutaciones que potencian la oligomerización en CDC. Representación esquemática que ilustra pares de interacción Fc:Fc con eficacia aumentada según los aspectos mutante simple y mutante doble de la invención. (C) Efecto observado de mutaciones inhibitoras de la oligomerización en CDC. Representación esquemática que ilustra cómo al menos dos mutaciones inhibitoras de la oligomerización que se compensan entre sí pueden combinarse en una molécula (aspecto de mutante doble) o separarse en dos moléculas (aspecto de mutante mixto) para restaurar o aumentar la interacción Fc:Fc según los aspectos de mutante doble y mutantes mixtos de la invención. Los mutantes mixtos consiguen una activación específica de la función efectora dependiente de la unión de ambos anticuerpos, que pueden reconocer diferentes dianas. (D) Efecto teórico de las mutaciones inhibitoras de la unión a C1q en CDC. Representación esquemática de las interacciones Fc:C1q, que ilustra que si las mutaciones inhiben la unión a C1q, no pueden combinarse o mezclarse para restaurar la actividad CDC, porque C1q no puede compensar el defecto introducido en el anticuerpo.

Figura 2: Alineación de secuencias de los segmentos Fc de IgG1, IgG1f, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM humanos correspondientes a los residuos P247 a K447 en la cadena pesada de IgG1, utilizando el software Clustal 2.1, numerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Las secuencias mostradas representan los residuos 130 a 330 de la región constante de la cadena pesada IgG1 humana (SEQ ID NO:1; UniProt No. de acceso P01857) y de la variante alotípica IgG1m(f); los residuos 126 a 326 de la región constante de la cadena pesada IgG2 (SEQ ID NO:2; UniProt No. de acceso P01859); y los residuos 177 a 377 de la región constante de la cadena pesada IgG3 (SEQ ID NO:2; UniProt No. de acceso P01860); y los residuos 127 a 327 de la región constante de la cadena pesada IgG4 (SEQ ID NO:4; UniProt No. de acceso P01861); y los residuos 225-428 de la región constante de IgE (UniProt accesión No. P01854); y los residuos 133-353 de la región constante de IgA1 (UniProt accesión No. P01876); y los residuos 120-340 de la región constante de IgA2 (UniProt accesión No. P01877); y los residuos 230-452 de la región constante IgM (UniProt No. de acceso P01871); y los residuos 176-384 de la región constante IgD (UniProt No. de acceso P01880).

45 Figura 3A y B: Alineación de secuencias del anticuerpo anti-EGFr 2F8 en un esqueleto IgG1 (SEQ ID NO:3), IgG4 (SEQ ID NO:5) y (parcial) IgG3 (SEQ ID NO:6). Se representa la numeración de aminoácidos según Kabat y según el índice EU (ambos descritos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

50 Figura 4: Vista detallada de las interacciones K439/S440 entre los Fc de moléculas adyacentes (Fc y Fc', respectivamente) en una disposición multimérica (por ejemplo, hexamérica), que ilustra la interacción entre moléculas Fc y Fc' de tipo silvestre, no modificadas.

Figura 5: Vista detallada de las interacciones K439/S440 entre los Fc de moléculas adyacentes (Fc y Fc', respectivamente) en una disposición multimérica (por ejemplo, hexamérica) que ilustra la interacción entre las moléculas Fc y Fc' variantes que comprenden las mutaciones K439E y S440K.

55 Figura 6: ELISA de unión a C1q con mutantes 7D8 Fc:Fc. Se recubrieron series de concentraciones de los anticuerpos indicados en los pocillos de una placa de microtitulación y se incubaron con una concentración fija de C1q. La eficiencia de unión a C1q fue comparable a la del 7D8 de tipo silvestre para todos los mutantes recubiertos, excepto I253D. Se muestra un representante de al menos 3 experimentos.

Figura 7: CDC mediada por variantes 7D8 en células Raji CD20-positivas. Se incubaron células Raji con los mutantes 7D8 (K439E, S440K, mutante doble K439E/S440K, mezcla K439E + S440K) y una serie de concentraciones de C1q para probar la eficacia CDC midiendo la lisis celular. Se muestra un gráfico representativo de experimentos repetidos.

5 Figura 8: CDC mediada por mutantes 7D8 (7D8-WT, K439E, S440K, mutante doble K439E/S440K, mezcla K439E + S440K) en células Daudi CD20 positivas. Se comprobó la eficacia de una serie de concentraciones de mutantes 7D8 para inducir CDC.

10 Figura 9: CDC mediada por mutantes del anticuerpo CD38 HuMAb 005 en células CD38 positivas. (A) Eficacia CDC en células Daudi mediante una serie de concentraciones de mutantes 005. (B) Eficacia CDC en células Raji mediante una serie de concentraciones de mutantes HuMAb 005. (C) Eficacia CDC del mutante E345R de HuMAb 005 con un 20% o 50% de NHS en células Wien133. (D) Eficacia CDC de los mutantes E345R de HuMAb 005 y 7D8 con 20% o 50% de NHS en células Raji. Se analizaron muestras de anticuerpos sin purificar aisladas de transfecciones transitorias. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de células transfectadas simuladas.

15 Figura 10: CDC por mutantes de tipo silvestre y E345R del anticuerpo CD38 HuMAb 005, (A) y del anticuerpo CD20 HuMAb 7D8 (B) en un experimento de competición con un péptido de unión a Fc. La lisis celular se midió después de la CDC en células Daudi opsonizadas con anticuerpo e incubadas con una serie de concentraciones del péptido DCAWHLGELVWCT de unión a Fc (SEQ ID NO:7). Se utilizaron muestras de anticuerpos sin purificar aisladas de transfecciones transitorias. Como control negativo, se utilizó sobrenadante de células transfectadas simuladas.

Figura 11: ADCC de células Daudi que expresan CD38 mediante el anticuerpo HuMAb 005 CD38 de tipo silvestre y la IgG1-005-E345R mutante. Se muestra la ADCC de PBMC de un donante, representada como % de lisis.

20 Figura 12: Unión de la IgG1-7D8 de tipo silvestre y de la IgG1-7D8-E345R mutante al FcRn humano, de cynomolgus y de ratón, determinada mediante ELISA a pH 6.

Figura 13: Concentraciones plasmáticas de IgG1-7D8 de tipo silvestre y de las variantes -E354R, -S440K y K322A tras la inyección intravenosa en ratones SCID.

Figura 14A, B, C y D: CDC en células Wien133 positivas para CD20 y CD38.

25 Figura 15A y B: Evaluación de la eficacia *in vivo* de IgG1-7D8-E345R en un modelo de xenoinjerto subcutáneo con células Raji-luc #2D1.

Figura 16A y B: Evaluación de la eficacia *in vivo* de IgG1-005-E345R en un modelo de xenoinjerto subcutáneo con células Raji-luc #2D1.

30 Figura 17: CDC en células Wien133 CD38-positivas, EGFR-negativas por anticuerpo biespecífico CD38/EGFR con la mutación E345R.

Figura 18A y B: CDC en células Wien133 CD20-positivas, CD38-negativas o células Raji por anticuerpo biespecífico CD20/CD38 con y sin la mutación E345R.

Figura 19: CDC en células A431 EGFR-positivas por el anticuerpo EGFR 2F8 con la mutación E345R.

Figura 20A y B: CDC mediada por anticuerpos mutantes E345R.

35 Figura 21: Análisis de colocalización de anticuerpos TF (FITC) con el marcador lisosomal LAMP1 (APC).

Figura 22A-D: La introducción de E345R produjo una muerte mediada por CDC mejorada en comparación con el rituximab de tipo silvestre probado en diferentes líneas de células B.

40 Figura 22E: La introducción de E345R produjo un aumento de la muerte máxima mediada por CDC en comparación con el rituximab de tipo silvestre, independientemente de los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del complemento CD46 (A), CD55 (B) o CD59 (C) en diferentes líneas de células B con niveles de expresión de CD20 comparables.

Figura 23: Cinética de CDC. Los anticuerpos E345R producen una lisis más rápida y sustancial de la célula diana por CDC en comparación con los anticuerpos de tipo silvestre.

45 Figura 24: Cinética de CDC. La introducción de la mutación E345R en el anticuerpo biespecífico CD38xCD20 produce una lisis de la célula diana mediada por CDC más rápida y sustancial.

Figura 25 A-B: Cinética de CDC. La introducción de la mutación E345R en los anticuerpos biespecíficos CD38xEGFR (A) y CD20xEGFR (B) que se unen monovalentemente a las células Raji EGFR negativas, da lugar a una lisis celular diana mediada por CDC más rápida y sustancial.

Figura 26A-F: CDC en células Wien133 mediante una combinación de un anticuerpo de tipo silvestre con un anticuerpo mutante que contiene (A-C) E345R y Q386K o (D-F) E345R, E430G y Q386K. Los mutantes IgG1-b12 no se unen a las células Wien133 y se utilizaron como anticuerpos de control negativo.

Figura 27: Eficacia de CDC de los anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que contienen la mutación E345R.

- 5 Figura 28: La introducción de la mutación E345R estabilizadora de Fc-Fc en el anticuerpo CD38 005 de tipo silvestre produce una muerte mejorada de células CLL primarias en un ensayo CDC *ex vivo* (promedio $\pm$ error estándar de la media).

Figura 29: Unión de FcRn de IgG1-005 de tipo silvestre y mutantes de IgG1-005 a FcRn humano, de ratón y de cynomolgus a pH 6.0, determinada por ELISA.

- 10 Figura 30: Eficacia de CDC en un 20% de suero humano normal de varios mutantes de rituximab, rituximab de tipo silvestre y anticuerpo de control negativo irrelevante IgG1-b12 en las líneas celulares Ramos y SU-DHL-4.

Figura 31: Generación de C4d en suero humano normal de IgG1-005 de tipo silvestre, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, e IgG1-005-S440Y, e IgG agregada por calor (HAG) (control positivo) determinado mediante ELISA de fragmento C4d de Micro Vue.

- 15 Figura 32A/B: Tasa de depuración plasmática de la IgG1-005 de tipo silvestre administrada y de las variantes de anticuerpos IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430F, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430T, e IgG1-005-S440Y en ratones SCID según se determinó mediante ELISA de IgG humana total (Figura 32A) y mediante ELISA específica de CD38 humana (Figura 32B).

Descripción detallada de la invención

- 20 Como se describe aquí, sorprendentemente, las mutaciones en aminoácidos que no están directamente implicados en la unión a Fc:C1q pueden, no obstante, aumentar la CDC de un anticuerpo, y también pueden mejorar otras funciones efectoras del anticuerpo mediadas por Fc. Esto apoya la hipótesis de que las moléculas de anticuerpos, como los anticuerpos IgG1, pueden formar estructuras oligoméricas que posteriormente se unen a C1q. Además, mientras que algunas mutaciones disminuían la inducción de CDC, algunas combinaciones de tales mutaciones en la
25 misma molécula de anticuerpo o en moléculas diferentes restablecían la inducción de CDC y mostraban una mayor especificidad para la oligomerización de anticuerpos, promoviendo así una inducción de CDC más específica. Las mutaciones particulares que aumentan la respuesta CDC también se caracterizaron por una respuesta ADCC mejorada, mayor avidéz, mayor internalización y eficacia *in vivo* en un sistema modelo de tumor de ratón, como se muestra en los Ejemplos. Estos descubrimientos permiten nuevas terapias basadas en anticuerpos con mayor capacidad de inducción de CDC, inducción de CDC más selectiva y/u otras funciones efectoras mejoradas.

- Todas las variantes polipeptídicas, incluidas las variantes de anticuerpos, de la invención comprenden una región de unión y un dominio Fc de longitud parcial o completa de una inmunoglobulina que comprende una o más mutaciones en el segmento correspondiente a los residuos de aminoácidos E345 a S440 en IgG1. Sin limitarse a la teoría, se cree que las mutaciones identificadas dan lugar a una inducción de CDC más eficaz y/o más específica basada en tres
35 principios diferentes, representados esquemáticamente en la Figura 1, y denominados en el presente documento "mutante simple", "mutante doble" y "mutantes mixtos".

- Los efectos C1q y/o CDC mejorados de las variantes de la invención son principalmente sólo detectables en ensayos que permiten la formación de oligómeros de anticuerpo, como en ensayos basados en células en los que el antígeno no está fijado sino presente en una membrana fluida. Además, puede verificarse según los principios mostrados en la
40 Figura 1C que estos efectos resultan de un oligómero de anticuerpo más estable y no de una modificación de un sitio de unión directa de C1q.

Definiciones

El término "mutante simple" debe entenderse como una variante de la presente invención que ha aumentado la CDC y también puede tener otras funciones efectoras mejoradas en comparación con el polipéptido o anticuerpo progenitor.

- 45 El término "mutante doble", debe entenderse como una variante que comprende al menos dos mutaciones en dicho segmento, y ha mejorado la CDC y también puede tener otras funciones efectoras mejoradas en comparación con una variante que comprende sólo una de dichas al menos dos mutaciones.

- El término "mutante mixto" debe entenderse como una variante que proporciona una CDC aumentada y, opcionalmente, también otras funciones efectoras mejoradas cuando se utiliza en combinación con una segunda variante del mismo polipéptido o anticuerpo, o de uno diferente, que comprende una mutación en un residuo de
50 aminoácido diferente en dicho segmento, en comparación con una o más de la variante, la segunda variante y el polipéptido o anticuerpo progenitor solos.

El término "polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" se refiere en el contexto de la presente invención a un polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región

de unión capaz de unirse a cualquier molécula, como un polipéptido, por ejemplo presente en una célula, bacteria o virión. El dominio Fc de una inmunoglobulina se define como el fragmento de un anticuerpo que se generaría típicamente tras la digestión de un anticuerpo con papaína (lo que es conocido para un experto en la materia) que incluye las dos regiones CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una región de conexión, por ejemplo, una región bisagra.

El dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo define el isotipo del anticuerpo, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD o IgE. El dominio Fc media las funciones efectoras de los anticuerpos con receptores de la superficie celular llamados receptores Fc y proteínas del sistema del complemento. La región de unión puede ser una secuencia polipeptídica, como una proteína, un ligando proteico, un receptor, una región de unión a antígeno o una región de unión a ligando capaz de unirse a una célula, bacteria o virión. Si la región de unión es, por ejemplo, un receptor, el "polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" puede haberse preparado como una proteína de fusión del dominio Fc de una inmunoglobulina y dicha región de unión. Si la región de unión es una región de unión a antígeno, el "polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" puede ser un anticuerpo, como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un anticuerpo de cadena pesada solamente o una fusión ScFv-Fc. El polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión puede comprender típicamente una región de conexión, por ejemplo una región bisagra, y dos regiones CH2-CH3 de la cadena pesada de una inmunoglobulina, por lo que el "polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" puede ser un "polipéptido que comprende al menos un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión". El término "dominio Fc de una inmunoglobulina" significa en el contexto de la presente invención que están presentes una región de unión, por ejemplo bisagra dependiendo del subtipo de anticuerpo, y la región CH2 y CH3 de una inmunoglobulina, por ejemplo una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgM o IgE humanas. El polipéptido no se limita al origen humano, sino que puede ser de cualquier origen, como por ejemplo de ratón o de cynomolgus.

El término "región CH2" o "dominio CH2" utilizado en el presente documento se refiere a la región CH2 de una inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 228-340 según el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

El término "región CH3" o "dominio CH3" utilizado en el presente documento se refiere a la región CH3 de una inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 según el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada se compone típicamente de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone normalmente de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las cadenas pesadas están interconectadas mediante enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Cada cadena ligera se compone normalmente de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone normalmente de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)). A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran en el presente documento de acuerdo con el índice EU (descrito en Kabat, E.A. et al., *Sequences of proteins of immunological interest*. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)).

El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de periodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente ocho horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente de tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, etc., o cualquier otro periodo relevante definido funcionalmente (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o un tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). El anticuerpo de la presente invención comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno. Un anticuerpo contiene generalmente dos regiones CH2-CH3 y una región de conexión, por ejemplo, una región bisagra, por ejemplo, al menos un dominio Fc. Así, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una región Fc y una región de unión a antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un

antígeno. Las regiones constantes o "Fc" de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (tal como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento como C1q, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo multiespecífico, como un anticuerpo biespecífico o una molécula similar.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítomos diferentes, normalmente no solapados. Dichos epítomos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes. Si los epítomos están en dianas diferentes, dichas dianas pueden estar en la misma célula o en células o tipos celulares diferentes. Como se ha indicado anteriormente, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, el término anticuerpo incluye fragmentos de un anticuerpo que comprenden al menos una parte de una región Fc y que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Dichos fragmentos pueden obtenerse mediante cualquier técnica conocida, como la escisión enzimática, la síntesis de péptidos y las técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término "Ab" o "anticuerpo" se incluyen, sin limitación, los anticuerpos monovalentes (descritos en WO2007059782 por Genmab); los anticuerpos de cadena pesada, que consisten únicamente de dos cadenas pesadas y se encuentran de forma natural, por ejemplo, en camélidos (por ejemplo, Hamers-Casterman (1993) *Nature* 363:446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), dominio diseñado por intercambio de hebras (anticuerpo SEED o Seed) que son moléculas asimétricas y biespecíficas similares a anticuerpos (Merck, WO2007110205); Triomab (Fresenius, Lindhofer et al. (1995) *J Immunol* 155:219); Fc Δ Adp (Regeneron, WO2010151792), Andamio azimétrico (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Inmunoglobulina de doble dominio variable (Abbott, DVD-Ig, Patente U.S. No. 7,612,181); Anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diabody (ImClone/Eli Lilly), Formatos de anticuerpos de botones en ojal (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); Formatos de anticuerpos de dirección electrostática. (Amgen, EP1870459 and WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304A2); IgG1 e IgG2 biespecíficos (Rinat neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus), Anticuerpos de dominio de doble direccionamiento (GSK/Domantis), Anticuerpos dos en uno que reconocen dos dianas (Genentech, NovImmune), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), CovX-body (CovX/Pfizer), Biespecífico tipo IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. *J Immunol Methods*, 2007. 318(1-2): p. 65-74), y DIG-body and PIG-body (Pharmabce,), y Moléculas de redireccionamiento de doble afinidad (Fc-DART o Ig-DART, de MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), Zybodies (Zyngenia), enfoques con cadena ligera común (Crucell/ Merus, US7262028) o cadenas pesadas comunes (κ LBodies de NovImmune), así como proteínas de fusión que comprenden una secuencia polipeptídica fusionada a un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio Fc, como las fusiones scFv, como BsAb de ZymoGenetics/BMS), HERCULES de Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS de Emergent BioSolutions/Trubion, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., et al. *J Mol Biol*, 2009. 393(3): p. 672-92), fusión scFv de Novartis, fusión scFv de Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb de Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² de f-Star (WO2008/003116), y fusiones scFv duales. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (tales como anticuerpos monoclonales humanos), mezclas de anticuerpos (policlonales recombinantes) por ejemplo generados por tecnologías explotadas por Symphogen y Merus (Oligoclomics), y polipéptidos similares a anticuerpos, como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer potencialmente cualquier isotipo.

El término "anticuerpo de longitud completa", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo progenitor o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera correspondientes a los que se encuentran normalmente en un anticuerpo de tipo silvestre de ese isotipo.

El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones, inserciones o deleciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir los anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como el ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Los términos "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "mAb", o similares, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de Ab de composición molecular única. Una composición de anticuerpos monoclonales muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a los Abs que muestran una única especificidad de unión y que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAbs humanos pueden generarse mediante un hibridoma que incluya una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transcrómico, como un ratón transgénico, que tenga un genoma que comprenda un repertorio transgénico de cadena pesada humana y un repertorio transgénico de cadena ligera, reorganizado para producir un anticuerpo humano funcional y fusionado a una célula inmortalizada.

Tal como se utiliza aquí, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE, o IgM o cualquiera de sus alotipos como IgG1m(za) e IgG1m(f)) que está codificada por genes de

región constante de cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada puede combinarse con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

El término "anticuerpo monovalente" significa en el contexto de la presente invención que una molécula de anticuerpo es capaz de unirse con sólo uno de los dominios de unión del anticuerpo a un antígeno, por ejemplo, tiene una única interacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto no es capaz de entrecruzamiento de antígenos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diana" en el contexto de la presente invención debe entenderse como una molécula a la que la región de unión del polipéptido que comprende un dominio Fc y una región de unión, cuando se utiliza en el contexto de la unión de un anticuerpo incluye cualquier antígeno hacia el que se dirige el anticuerpo elevado. Los términos "antígeno" y "diana" pueden utilizarse indistintamente en relación con un anticuerpo y tienen el mismo significado y finalidad con respecto a cualquier aspecto o divulgación de la presente invención.

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

Una "variante" o "variante de anticuerpo" o "variante de un anticuerpo progenitor" de la presente invención es una molécula de anticuerpo que comprende una o más mutaciones en comparación con un "anticuerpo progenitor". Los diferentes términos pueden usarse indistintamente y tienen el mismo significado y finalidad con respecto a cualquier aspecto o divulgación de la presente invención. Los formatos de anticuerpos progenitores de ejemplo incluyen, sin limitación, un anticuerpo de tipo silvestre, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo que contiene Fc, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo humano o cualquier combinación de los mismos. Del mismo modo, una "variante" o "una variante de un polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" o "una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión" de la presente invención es un "polipéptido que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión", que comprende una o más mutaciones en comparación con un "polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión". Los diferentes términos pueden utilizarse indistintamente y tienen el mismo significado y finalidad con respecto a cualquier aspecto o divulgación de la presente invención. Las mutaciones de ejemplo incluyen delecciones de aminoácidos, inserciones y sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos original. Las sustituciones de aminoácidos pueden intercambiar un aminoácido nativo por otro aminoácido natural o por un derivado de aminoácido no natural. La sustitución de aminoácidos puede ser conservadora o no conservadora. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservadoras pueden definirse por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las tres tablas siguientes:

Clases de residuos de aminoácidos para sustituciones conservadoras

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

Clases alternativas de sustitución conservadora de residuos de aminoácidos

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

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de los residuos de aminoácidos

Residuos que contienen grupos alcohólicos	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V, y M
Residuos asociados al cicloalqueno	F, H, W, y Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, y Y
Residuos con carga negativa	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T
Residuos con carga positiva	H, K, y R
Pequeños residuos	A, C, D, G, N, P, S, T, y V
Residuos muy pequeños	A, G, y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

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

Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;

Se utilizan códigos de tres letras o de una letra, incluidos los códigos Xaa y X para indicar residuos de aminoácidos. Por consiguiente, la notación "E345R" o "Glu345Arg" significa que la variante comprende una sustitución de ácido glutámico por arginina en la posición del aminoácido de la variante correspondiente al aminoácido en la posición 345 en el anticuerpo progenitor.

10

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

Posición - aminoácido sustituido; se utiliza la notación, por ejemplo, "448E".

15 Dicha notación es particularmente pertinente en relación con las modificaciones en una serie de polipéptidos o anticuerpos homólogos.

Del mismo modo, cuando la identidad de los residuos de aminoácidos de sustitución es irrelevante:

Aminoácido original - posición; o "E345".

Para una modificación en la que los aminoácidos originales y/o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de un aminoácido, pero no todos, la sustitución de ácido glutámico por arginina, lisina o triptófano en la posición 345:

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

Además, el término "una sustitución" abarca una sustitución en una cualquiera de los otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido E en la posición 345 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W, y 345Y. Esto equivale, por cierto, a la designación 345X, en la que la X designa cualquier aminoácido. Estas sustituciones también pueden designarse E345A, E345C, etc, o E345A,C,ect, o E345A/C/ect. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones aquí mencionadas, para incluir aquí específicamente una cualquiera de tales sustituciones.

25

Un aminoácido o segmento de una secuencia que "corresponde" a un aminoácido o segmento de otra secuencia es aquel que (i) se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa estándar de alineación de secuencias como ALIGN, ClustalW o similar, normalmente con los ajustes predeterminados y (ii) tiene una identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 de al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%. Por ejemplo, los alineamientos de secuencias mostrados en las Figuras 2 y 3 pueden usarse para identificar cualquier aminoácido en la secuencia Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 que corresponda a un aminoácido particular en la secuencia Fc de IgG1.

La presente invención se refiere a variantes, a saber, polipéptidos progenitores y anticuerpos progenitores, y/o polipéptidos variantes y anticuerpos variantes, que tienen un cierto grado de identidad con los aminoácidos P247 a K447 de SEQ ID Nos:1, 2, 3, 4, y 5, designándose en lo sucesivo tales anticuerpos progenitores y/o variantes como "anticuerpos homólogos".

A efectos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, así como el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se determina mediante el programa "align", que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento global). El programa se utiliza para alinear secuencias polipeptídicas y nucleotídicas. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se utiliza para alineaciones de polipéptidos, y la matriz de identidad por defecto se utiliza para alineaciones de nucleótidos, la penalización del primer residuo de una brecha es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para los demás residuos de una brecha son -2 para los polipéptidos y -4 para los nucleótidos.

"Align" forma parte de la versión v20u6 del paquete FASTA (véase W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98). Las alineaciones de proteínas FASTA utilizan el algoritmo Smith-Waterman sin limitación en el tamaño de las brechas (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que participa en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, por oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias de ejemplo incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (tales como células B y células T, incluidas células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc (FcR) o receptores del complemento y desempeñan funciones inmunitarias específicas. En algunas divulgaciones, una célula efectora tal como, por ejemplo, una célula asesina natural, es capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células de Kupffer que expresan FcRs, están implicados en la eliminación específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o la unión a células que presentan antígenos. En algunas divulgaciones, la ADCC puede potenciarse aún más mediante la activación clásica del complemento impulsada por anticuerpos, lo que da lugar a la deposición de fragmentos de C3 activados en la célula diana. Los productos de escisión de C3 son ligandos de los receptores del complemento (CR), como CR3, expresados en células mieloides. El reconocimiento de los fragmentos del complemento por los RC en las células efectoras puede promover una ADCC mejorada mediada por el receptor Fc. En algunas divulgaciones, la activación clásica del complemento impulsada por anticuerpos da lugar a fragmentos de C3 en la célula diana. Estos productos de escisión de C3 pueden promover la citotoxicidad celular directa dependiente del complemento (CDCC). En algunas divulgaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, una partícula diana o una célula diana. La expresión de un FcR o receptor del complemento particular en una célula efectora puede estar regulada por factores humorales como las citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de FcγRI está sobre regulada por interferón γ (IFN γ) y/o G-CSF. Esta expresión aumentada incrementa la actividad citotóxica de las células portadoras de FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o fagocitar o lisar una célula diana. En algunas divulgaciones, la activación clásica del complemento impulsada por anticuerpos da lugar a fragmentos de C3 en la célula diana. Estos productos de escisión de C3 pueden promover la fagocitosis directa por parte de las células efectoras o indirectamente al potenciar la fagocitosis mediada por anticuerpos.

El término "vector", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de inducir la transcripción de un segmento de ácido nucleico ligado al vector. Un tipo de vector es un "plásmido", que tiene la forma de un bucle circular de ADN de doble cadena. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que el segmento de ácido nucleico puede ligarse al genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y los vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (tales como los vectores no episómicos de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella y, por tanto, replicarse junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen tener la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la presente invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, como los vectores virales (tal como los retrovirus de replicación defectuosa, los adenovirus y los virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias medioambientales, dicha progenie puede no ser idéntica a la célula madre, pero aún así se incluye en el ámbito del término "célula huésped" tal como se utiliza en el presente documento. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, como células CHO, células HEK-293, células PER.C6, células NS0 y células linfocíticas, y células procariotas como *E. coli* y otros huéspedes eucariotas como células vegetales y hongos.

El término "transfectoma", tal como se utiliza aquí, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan el Ab o un antígeno diana, como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluidas células de levadura.

El término "preparación" se refiere a preparaciones de variantes de anticuerpos y mezclas de diferentes variantes de anticuerpos que pueden tener una mayor capacidad para formar oligómeros cuando interactúan con el antígeno asociado a una célula (por ejemplo, un antígeno expresado en la superficie de la célula), una membrana celular, un virión u otra estructura, permitiendo así una mayor unión C1q, activación del complemento, CDC, ADCC, ADCP, otra función efectora mediada por Fc, internalización, modulación a la baja, apoptosis, captación de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), avidéz o una combinación de cualquiera de ellas. En los Ejemplos se proporcionan ensayos de ejemplo para, por ejemplo, avidéz de unión a C1q (Ejemplo 4), CDC (Ejemplos 5, 6 y 10, 16, 19, 22, 23, 24, 25, y 35); ADCC (Ejemplo 12), eficacia in vivo (Ejemplos 20, 21), tasas de depuración plasmática (Ejemplo 37), unión a FcRn (Ejemplo 34), y activación del complemento en fase fluida independiente de la diana (Ejemplo 36). Las variantes según los aspectos aquí denominados "mutantes únicos", "mutantes dobles" y "mutantes mixtos" se describen con más detalle a continuación, junto con procesos de ejemplo para su preparación y métodos de uso.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "afinidad" es la fuerza de unión de una molécula, por ejemplo un anticuerpo, a otra, por ejemplo una diana o antígeno, en un único sitio, como la unión monovalente de un sitio de unión individual de un anticuerpo a un antígeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "avidéz" se refiere a la fuerza combinada de múltiples sitios de unión entre dos estructuras, tal como entre múltiples sitios de unión a antígenos de anticuerpos que interactúan simultáneamente con una diana o, por ejemplo, entre anticuerpo y C1q. Cuando hay más de una interacción de unión, las dos estructuras sólo se disociarán cuando se disocien todos los sitios de unión y, por tanto, la velocidad de disociación será más lenta que para los sitios de unión individuales, proporcionando así una mayor fuerza de unión total efectiva (avidéz) en comparación con la fuerza de unión de los sitios de unión individuales (afinidad).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oligómero" se refiere a una molécula que consta de más de una unidad monomérica, pero de un número limitado de ellas (por ejemplo, anticuerpos), en contraste con un polímero que, al menos en principio, consta de un número ilimitado de monómeros. Algunos ejemplos de oligómeros son los dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros. A menudo se utilizan prefijos griegos para designar el número de unidades monoméricas del oligómero; por ejemplo, un tetrámero está compuesto por cuatro unidades y un hexámero por seis unidades.

El término "oligomerización", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un proceso que convierte monómeros en un grado finito de polimerización. En el presente documento, se observa que la oligomerización de los dominios Fc tiene lugar después de la unión a la diana por parte de polipéptidos que contienen dominios Fc, tales como anticuerpos, preferiblemente, pero sin limitarse a ello, en una superficie celular. La oligomerización de anticuerpos puede evaluarse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión a C1q en la superficie celular (tal como se describe en los Ejemplos 4 y 9), ensayo de eficacia de C1q (tal como se describe en el Ejemplo 5) y citotoxicidad dependiente del complemento descrita en los Ejemplos 6, 10 y 19).

El término "unión a C1q", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la unión a C1q en el contexto de la unión a C1q a un anticuerpo unido a su antígeno. Debe entenderse que el anticuerpo unido a su antígeno ocurre tanto in vivo como in vitro en el contexto descrito en el presente documento. La unión a C1q puede evaluarse, por ejemplo, usando anticuerpo inmovilizado en una superficie artificial (por ejemplo, plástico en placas para ELISA, como se describe en el ejemplo 3) o usando unido a un antígeno predeterminado en una superficie celular o viriónica (tal como se describe en los ejemplos 4 y 9). La unión a C1q a un oligómero de anticuerpo debe entenderse en el presente documento como una interacción multivalente que da lugar a una unión de alta avidéz.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "activación del complemento" se refiere a la activación de la vía clásica del complemento, que se desencadena por la unión del componente del complemento C1q a un anticuerpo unido a su antígeno. C1q es la primera proteína en los primeros acontecimientos de la cascada clásica del complemento que implica una serie de reacciones de escisión que culminan en la formación de una actividad enzimática denominada C3 convertasa, que escinde el componente del complemento C3 en C3b y C3a. C3b se une covalentemente a C5 en la membrana para formar C5b que, a su vez, desencadena los eventos tardíos de la activación del complemento en los que los componentes terminales del complemento C5b, C6, C7, C8 y C9 se reúnen en el complejo de ataque de membrana (MAC). La cascada del complemento da lugar a la creación de poros debido a los

cuales se produce la lisis celular, también conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La activación del complemento puede evaluarse utilizando la eficacia de C1q (tal como se describe en el Ejemplo 5), la cinética de CDC (tal como se describe en los Ejemplos 28, 29 y 30), ensayos de CDC (tal como se describe en los Ejemplos 6, 10, 19, 25, 27, 33 y 35) o mediante el método Deposición celular de C3b y C4b descrito en Beurskens et al 1 de abril de 2012 vol. 188 No. 7 3532-3541.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento" ("CDC"), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse al proceso de activación del complemento mediado por anticuerpos que conduce a la lisis del anticuerpo unido a su diana en una célula o virión como resultado de poros en la membrana que se crean por el ensamblaje MAC. La CDC puede evaluarse mediante un ensayo in vitro, tal como un ensayo de CDC en el que se utiliza suero humano normal como fuente de complemento, tal como se describe en los Ejemplos 6, 10, 19, 25, 27, 33 y 35, o en un ensayo de eficacia de C1q, tal como se describe en el Ejemplo 5, en el que el suero humano normal se ha limitado en C1q.

El término "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" ("ADCC"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mecanismo de muerte de células diana o viriones recubiertos de anticuerpos por células que expresan receptores Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La ADCC puede determinarse usando métodos tales como, por ejemplo, el ensayo ADCC descrito en el Ejemplo 12.

El término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" ("ADCP"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mecanismo de eliminación de células diana o viriones recubiertos de anticuerpos mediante internalización por los fagocitos. Las células diana o viriones recubiertos de anticuerpos internalizados están contenidos en una vesícula llamada fagosoma, que luego se fusiona con uno o más lisosomas para formar un fagolisosoma. La ADCP puede evaluarse utilizando un ensayo de citotoxicidad in vitro con marcófagos como células esforzadoras y microscopía de vídeo, tal como describen van Bij et al. en Journal of Hepatology Volumen 53, Número 4, octubre de 2010, Páginas 677-685. O como se describe en el ejemplo 14 para, por ejemplo, *S. aureus* fagocitado por PMN.

El término "citotoxicidad celular dependiente del complemento" ("CDCC"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mecanismo de muerte de células o viriones diana por células que expresan receptores del complemento que reconocen los productos de escisión del complemento 3 (C3) que están unidos covalentemente a las células o viriones diana como resultado de la activación del complemento mediada por anticuerpos. La CDCC puede evaluarse de forma similar a la descrita para la ADCC.

El término "semivida plasmática", tal como se utiliza aquí, indica el tiempo que tarda en reducirse la concentración del polipéptido en el plasma sanguíneo a la mitad de su concentración inicial durante la eliminación (después de la fase de distribución). En el caso de los anticuerpos, la fase de distribución suele ser de 1 a 3 días, durante la cual se produce una disminución de aproximadamente el 50% de la concentración en el plasma sanguíneo debido a la redistribución entre el plasma y los tejidos. La semivida plasmática puede medirse por métodos bien conocidos en la técnica.

El término "tasa de depuración plasmática", tal como se utiliza en el presente documento, es una medida cuantitativa de la tasa a la que un polipéptido se elimina de la sangre tras su administración a un organismo vivo. La tasa de depuración plasmática puede calcularse como la dosis/AUC (mL/día/kg), en la que el valor AUC (área bajo la curva) se determina a partir de las curvas de concentración-tiempo de acuerdo con el Ejemplo 37.

El término "submodulación", tal como se utiliza aquí, pretende referirse a un proceso que disminuye el número de moléculas, como antígenos o receptores, en una superficie celular, por ejemplo, mediante la unión de un anticuerpo a un receptor.

El término "internalización", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier mecanismo por el que un anticuerpo o polipéptido que contiene Fc se internaliza en una célula que expresa la diana desde la superficie celular y/o desde el medio circundante, por ejemplo, mediante endocitosis. La internalización de un anticuerpo puede evaluarse mediante un ensayo directo que mida la cantidad de anticuerpo internalizado (tal como, por ejemplo, el ensayo de co-localización lisosomal descrito en el Ejemplo 26).

El término "conjugado anticuerpo-fármaco", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo o polipéptido que contiene Fc con especificidad para al menos un tipo de célula maligna, un fármaco y un enlazador que acopla el fármaco a, por ejemplo, el anticuerpo. El enlazador es escindible o no escindible en presencia de la célula maligna; en este caso, el conjugado anticuerpo-fármaco mata la célula maligna.

El término "captación de conjugado anticuerpo-fármaco", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso en el que los conjugados anticuerpo-fármaco se unen a una diana en una célula seguido de captación/engulfamiento por la membrana celular y, por lo tanto, se introducen en la célula. La captación de conjugados anticuerpo-fármaco puede evaluarse como "internalización mediada por anticuerpos y muerte celular por ADC anti-TF en un ensayo de mortandad in vitro", como se describe en WO 2011/157741.

El término "apoptosis", tal como se utiliza aquí, se refiere al proceso de muerte celular programada (PCD) que puede ocurrir en una célula. Los acontecimientos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos (morfología) y a la muerte. Estos cambios incluyen la formación de burbujas, el encogimiento celular, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN cromosómico. La unión de un anticuerpo a un determinado receptor puede inducir la apoptosis.

La unión al receptor Fc puede medirse indirectamente como se describe en el Ejemplo 12.

El término "FcRn", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al receptor Fc neonatal, que es un receptor Fc. Se descubrió por primera vez en roedores como un receptor único capaz de transportar IgG desde la leche materna a través del epitelio del intestino del roedor recién nacido hasta el torrente sanguíneo del recién nacido. Estudios posteriores revelaron la existencia de un receptor similar en humanos. En los humanos, sin embargo, se encuentra en la placenta para ayudar a facilitar el transporte de IgG de la madre al feto en crecimiento y también se ha demostrado que desempeña un papel en el control del recambio de IgG. El FcRn se une a la IgG a un pH ácido de 6.0-6.5, pero no a un pH neutro o superior. Por lo tanto, el FcRn puede unir IgG del lumen intestinal (el interior del intestino) a un pH ligeramente ácido y garantizar un transporte unidireccional eficiente al lado basolateral (el interior del cuerpo) donde el pH es de neutro a básico (pH 7.0-7.5). Este receptor también desempeña un papel en el salvamento adulto de IgG a través de su aparición en la vía de endocitosis en las células endoteliales. Los receptores FcRn en los endosomas ácidos se unen a la IgG internalizada mediante pinocitosis, reciclandola a la superficie celular, liberándola al pH básico de la sangre, evitando así que sufra degradación lisosomal. Este mecanismo puede explicar la mayor semivida de la IgG en la sangre en comparación con otros isotipos. Los ejemplos 13 y 34 describen un ensayo que muestra la unión de IgG a FcRn a pH 6.0 en ELISA.

El término "Proteína A", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una proteína de superficie MSCRAMM de 56 kDa que se encuentra originalmente en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Está codificada por el gen spa y su regulación está controlada por la topología del ADN, la osmolaridad celular y un sistema de dos componentes denominado ArlS-ArlR. Se ha utilizado en la investigación bioquímica por su capacidad para unirse a las inmunoglobulinas. Se compone de cinco dominios homólogos de unión a Ig que se pliegan en un haz de tres hélices. Cada dominio es capaz de unir proteínas de muchas especies de mamíferos, sobre todo IgG. Se une a la región Fc de cadena pesada de la mayoría de las inmunoglobulinas (solapándose con el sitio de unión conservado de los receptores FcRn) e interactúa también con la región Fab de la familia VH3 humana. Mediante estas interacciones en el suero, las moléculas de IgG se unen a la bacteria a través de su región Fc en lugar de hacerlo únicamente a través de sus regiones Fab, por lo que la bacteria interrumpe la opsonización, la activación del complemento y la fagocitosis.

El término "proteína G", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína de unión a inmunoglobulinas expresada en bacterias estreptocócicas de los grupos C y G, muy parecida a la Proteína A, pero con diferentes especificidades. Se trata de una proteína de superficie celular de 65 kDa (proteína G G148) y 58 kDa (proteína G C40) que ha encontrado aplicación en la purificación de anticuerpos a través de su unión a la región Fc.

Métodos para afectar la CDC de un polipéptido

Debe entenderse que todas las divulgaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo, sin alterar la activación del complemento independiente de la diana en fase fluida de un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, dicho método comprende introducir una mutación en el anticuerpo progenitor en un residuo de aminoácido correspondiente a E430G o E430S en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, evaluar la respuesta CDC inducida por el anticuerpo variante cuando se une a la superficie de una célula que expresa antígeno en presencia de células efectoras o complemento en comparación con el anticuerpo progenitor; evaluar la actividad del complemento en fase fluida independiente de la diana del anticuerpo variante en comparación con el anticuerpo progenitor incubando el anticuerpo en suero humano normal y determinando la generación de C4d en comparación con el anticuerpo progenitor; y seleccionar un anticuerpo variante que tenga una respuesta CDC aumentada y una activación del complemento en fase independiente de la diana inalterada.

En una divulgación el polipéptido progenitor puede ser un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

La introducción de una mutación en un polipéptido progenitor de acuerdo con un método o uso de la presente invención da como resultado un polipéptido variante (que también puede denominarse "variante" en el presente documento). Así, el método o métodos de la presente invención pueden realizarse para obtener cualquier variante o polipéptido variante como se describe en el presente documento.

El polipéptido variante obtenido a partir de un método o uso de la presente invención tiene una CDC aumentada en comparación con el polipéptido progenitor. Típicamente, el efecto de un polipéptido sobre una función efectora puede

determinarse por el valor EC50, que es la concentración del polipéptido necesaria para obtener la mitad del valor de la lisis máxima.

La lisis máxima es la lisis obtenida cuando se utiliza una cantidad de saturación del polipéptido, donde saturación se refiere a la cantidad de polipéptido a la que todas las dianas del polipéptido están unidas por el polipéptido.

Los términos "aumentar la CDC", "mejorar la CDC", "aumentar una función efectora" o "mejorar una función efectora" se refieren, en el contexto de la presente invención, a una disminución del valor EC50 del polipéptido variante en comparación con el polipéptido progenitor. La disminución del valor EC50 puede ser, por ejemplo, al menos o aproximadamente 2 veces, tal como al menos o aproximadamente 3 veces, o al menos o aproximadamente 5 veces, o al menos o aproximadamente 10 veces. Alternativamente, "aumentar la CDC", "mejorar la CDC", "aumentar una función efectora", o "mejorar una función efectora", significa que hay un aumento en la cantidad máxima de células lisadas (donde la cantidad total de células se fija en el 100%) por ejemplo, del 10% al 100% de todas las células, como por ejemplo, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% y aproximadamente el 100% en condiciones en las que el polipéptido progenitor lisaba menos del 100% de todas las células.

Se podría probar una variante para una función efectora aumentada o mejorada clonando el dominio variable de la cadena pesada IgG1-005 o IgG1-7D8 en la variante y probar su eficacia en ensayos CDC, tales como los descritos para Daudi (Ejemplo 6) y Wien (Ejemplo 10). Usando un dominio variable IgG1-7D8 HC y células Daudi, un aumento se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-7D8 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable IgG1-005 HC y células Daudi, un aumento se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-005 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable HC IgG1-7D8 y células Wien133, un aumento se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-7D8 en la condición estudiada, como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable IgG1-005 HC y células Wien133, un aumento se definiría por un aumento de la lisis máxima que oscila entre el 10% y el 100% de todas las células, tal como por aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% y aproximadamente un 100%. Un aumento de la eficacia de CDC también podría definirse por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-005 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor de EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima en condiciones en las que la lisis de las células Wien133 es detectable.

Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente que las mutaciones en estas posiciones específicas tienen un efecto mejorado sobre la CDC del anticuerpo variante, que se obtiene al introducir una o más mutaciones en un anticuerpo progenitor de acuerdo con un método de la presente invención (por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 19). Sin estar limitado por la teoría, se cree que mediante la sustitución de uno o más aminoácidos del grupo de posiciones mencionado anteriormente se estimula la oligomerización. Los anticuerpos se unen con mayor avidez (ejemplificado por el Ejemplo 2; el etiquetado directo de IgG-7D8-E345R dio como resultado un aumento de la unión a células Daudi en comparación con IgG-7D8-WT), lo que hace que los anticuerpos se unan durante más tiempo a las células y, de este modo, se habilitan diferentes funciones efectoras, por ejemplo, aumento de la unión a C1q, CDC de eficacia de C1q, ADCC, internalización, ADCP, y/o eficacia *in vivo*. Estos efectos se han ejemplificado mediante el Ejemplo 4 (unión a C1q a células), el Ejemplo 5 (eficacia de C1q en un ensayo CDC), los Ejemplos 6, 7, 27, 28, 29 y 35 (ensayo CDC), el Ejemplo 12 (ADCC), el Ejemplo 26 (internalización), los Ejemplos 21 y 22 (eficacia *in vivo*), la tasa de depuración plasmática (Ejemplo 37), la unión de FcRn (Ejemplo 34) y la activación del complemento en fase fluida independiente de la diana (Ejemplo 36).

Así, la mutación de un residuo de aminoácido seleccionado entre los correspondientes a E430X, tal como E430G, E430S, E430F, o E430T, E345X, tal como E345K, E345Q, E345R, o E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana también pueden denominarse aspecto de "mutante simple" o "mutaciones potenciadoras de CDC" en el contexto de la presente invención.

Así, se divulga también en el presente documento el método de aumento de CDC la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

También se divulga aquí en el método de aumento de CDC la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, el polipéptido progenitor es un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

También se divulga en el presente documento un método para aumentar la CDC y la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, dicho método comprende introducir una mutación en el polipéptido progenitor en uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a E430X, E345X, y S440W en la región Fc de una cadena pesada de IgG1 humana, donde X es cualquier aminoácido, tal como un aminoácido de origen natural.

En una divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En otra divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a las posiciones E345R, E430T y E430F en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, al menos otra función efectora del anticuerpo, como la unión a C1q, la activación del complemento, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la unión al receptor Fc-gamma, la unión a la Proteína A, la unión a la proteína G, la ADCP, la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), citotoxicidad potenciada por el complemento, unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado mediada por el anticuerpo, fagocitosis mediada por el anticuerpo (ADCP), internalización, apoptosis y/o unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado, tal como la ADCC.

En una divulgación, el polipéptido progenitor es un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En una divulgación, la CDC del anticuerpo progenitor aumenta cuando el anticuerpo progenitor se une a su antígeno en una célula que expresa el antígeno, en una membrana celular o en un virión.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo monoespecífico, biespecífico o multiespecífico.

También se divulga en el presente documento un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de un anticuerpo progenitor que es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una primera región de unión a antígeno, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una segunda región de unión a antígeno, en el que la primera y la segunda regiones de unión a antígeno se unen a diferentes epítomos del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y en el que el método comprende introducir una mutación en la primera y/o la segunda región CH2-CH3 en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en el que la primera región CH2-CH3 comprende una mutación adicional de aminoácidos en una posición seleccionada entre las correspondientes a K409, T366, L368, K370, D399, F405, e Y407 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la segunda región CH2-CH3 comprende una mutación adicional de aminoácidos en una posición seleccionada entre las correspondientes a F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en la que la mutación adicional de aminoácidos en la primera región CH2-CH3 es diferente de la mutación adicional de aminoácidos en la segunda región CH2-CH3.

En una divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En otra divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, el método comprende introducir una mutación en sólo uno del primer o segundo polipéptido del anticuerpo biespecífico.

En una divulgación, el método comprende introducir una mutación tanto en el primer como en el segundo polipéptido del anticuerpo biespecífico.

En una divulgación preferida, la mutación adicional de aminoácidos de la primera región CH2-CH3 está en la posición correspondiente a K409, tal como K409R, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la mutación adicional de aminoácidos de la segunda región CH2-CH3 está en la posición correspondiente a F405, tal como F405L, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

Los inventores de la presente invención también han demostrado que la introducción de una mutación en un anticuerpo progenitor en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 o S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana disminuye la función efectora del anticuerpo progenitor (Ejemplos 5, 6 y 10).

Como se muestra en el Ejemplo 6, la sustitución de aminoácidos de posición K439E o S440K como "mutantes únicos" disminuyó la CDC en comparación con una cualquiera de las primeras mutaciones según el método de la presente invención.

- 5 El anticuerpo variante obtenido a partir de dicho método de disminución de una función efectora tiene una función efectora disminuida en comparación con el anticuerpo progenitor. Típicamente, el efecto de un anticuerpo sobre una función efectora puede medirse por el valor EC50, que es la concentración del anticuerpo necesaria para obtener la mitad del valor de la lisis máxima.

La lisis máxima es la lisis obtenida cuando se utiliza una cantidad de saturación del anticuerpo, donde saturación se refiere a la cantidad de anticuerpo a la que todos los antígenos del anticuerpo están unidos por el anticuerpo.

- 10 El término "disminución de una función efectora" se refiere en el contexto de la presente invención a que hay un aumento en el valor EC50 del anticuerpo variante en comparación con el anticuerpo progenitor. El aumento en el valor EC50 puede ser, por ejemplo, al menos o aproximadamente 2 veces, tal como al menos o aproximadamente 3 veces, o al menos o aproximadamente 5 veces, o al menos o aproximadamente 10 veces. Alternativamente, "disminución de una función efectora" significa que hay una disminución de la cantidad máxima de células lisadas en, por ejemplo, del
15 10% al 100% de todas las células, tal como alrededor del 10%, alrededor del 20%, alrededor del 30%, alrededor del 40%, alrededor del 50%, alrededor del 60%, alrededor del 70%, alrededor del 80%, alrededor del 90% y alrededor del 100% en condiciones en las que el anticuerpo progenitor lisa menos del 100% de todas las células.

- Podría probarse una variante para función efectora disminuida clonando el dominio variable de la cadena pesada IgG1-005 o IgG1-7D8 en la variante y probar su eficacia en ensayos CDC, tales como los descritos para células Daudi (Ejemplo 6) y células Wien133 (Ejemplo 10). Usando un dominio variable IgG1-7D8 HC y células Daudi, una disminución se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-7D8 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable IgG1-005 HC y células Daudi, una disminución se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-005 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable HC IgG1-7D8 y células Wien133, una disminución se definiría por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-7D8 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima. Utilizando un dominio variable IgG1-005 HC y células Wien133, una disminución se definiría por una disminución de la lisis máxima que oscila entre el 10% y el 100% de todas las células, como por ejemplo en aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% y aproximadamente un 100%. Una disminución de la eficacia de CDC también podría definirse por una EC50 más de 2 veces inferior a la EC50 de IgG1-005 en la condición estudiada, tal como aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces o un valor EC50 más de 10 veces inferior, la concentración a la que se observa la lisis semimáxima en condiciones en las que la lisis de las células Wien133 es detectable.

- 40 También se divulga en el presente documento un método que comprende introducir la mutación en una o más posiciones distintas de S440Y y S440W, e introducir además una mutación

(i) en cada uno de los residuos de aminoácidos correspondientes a K439 y S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W,

- 45 (ii) en cada uno de los residuos de aminoácidos correspondientes a K447 y 448 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, como K447K/R/H y 448E/D en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, preferiblemente K447K y 448E en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, o bien

(iii) en cada uno de los residuos de aminoácidos correspondientes a K447, 448 y 449 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, como K447D/E, 448K/R/H y 449P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, preferiblemente K447E, 448K y 449P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

- 50 Con respecto a la divulgación en la que se introduce una mutación adicional como se describe en el paso (ii) o (iii) anterior, debe tenerse en cuenta que en circunstancias normales la lisina en la posición K447 se escinde durante la producción de anticuerpos en las células. Esto puede evitarse protegiendo la posición K447 añadiendo uno o más residuos de aminoácidos adicionales (tales como 448 o 448/449). Esto se describe con más detalle en el documento WO 2013/004841 (Genmab A/S).

- 55 En una divulgación, el método comprende introducir la mutación en una o más posiciones distintas de S440Y y S440W, y además introducir una mutación en cada uno de los residuos de aminoácido correspondientes a K439 y/o S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W.

En una divulgación preferida, la mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es K439D/E, y/o la mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es S440K/R.

5 En una divulgación, el polipéptido progenitor es un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. El anticuerpo biespecífico puede ser una cualquiera de las divulgaciones aquí descritas.

10 Además, cualquiera de las mutaciones enumeradas en la Tabla 1 puede introducirse en el anticuerpo biespecífico. El Ejemplo 24 muestra que la introducción de la mutación E345R en un anticuerpo biespecífico CD20xEGFR mejora la eficacia CDC. Los Ejemplos 23, 29 y 30 también describen algunas de las diferentes de anticuerpos biespecíficos que comprenden una mutación de acuerdo con la presente invención.

15 La introducción de mutaciones en ambos residuos de aminoácidos correspondientes a K439 y S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana en un anticuerpo progenitor, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W también se denomina en el presente documento aspecto de "mutante doble". Se ha descubierto que las mutaciones S440Y y S440W, como se describe en otra parte, aumentan la CDC cuando se introducen en un polipéptido progenitor.

20 Como también se describe en otra parte, los inventores de la presente invención han descubierto que la introducción de una mutación identificada en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 o S440 en la región Fc de una cadena pesada de IgG1 humana produce una disminución de una función efectora (Ejemplos 5, 6, 10). Sin embargo, cuando se introducen mutaciones inhibitoras en ambos residuos de aminoácidos correspondientes a K439 y S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, se restablece la disminución de la función efectora, haciéndola similar a la función efectora del anticuerpo progenitor sin una mutación en las mutaciones K439 y S440. Sin embargo, se cree que la presencia de las mutaciones K439 y S440, sin estar ligada a ninguna teoría, restringe la inducción de las funciones efectoras a los complejos oligoméricos que corresponden exclusivamente a los anticuerpos que comprenden tanto la mutación K439 como la S440. Así, si las mutaciones K439 y S440 se incluyen en un anticuerpo terapéutico, se cree, sin estar limitado por ninguna teoría, que cuando tales anticuerpos terapéuticos se administran a un paciente la inducción de funciones efectoras se limita a complejos de anticuerpos oligoméricos que contienen los anticuerpos terapéuticos que comprenden las mutaciones K439/S440 pero que no contienen los anticuerpos propios de los pacientes, que no comprenden las mutaciones K439 y S440, limitando así cualquier efecto secundario potencial causado por la interacción de un anticuerpo terapéutico con los anticuerpos propios de los pacientes.

30 Cuando se combinan las mutaciones de posición K439 y/o S440 con la primera mutación, se obtiene una mejora de CDC y se aumenta la especificidad de CDC. De forma similar, puede obtenerse una mejora y un aumento de la especificidad de CDC introduciendo las mutaciones divulgadas en las divulgaciones (ii) y (iii) anteriores.

35 También se divulga en el presente documento un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de una combinación de al menos un primer y un segundo polipéptido progenitor, en el que el al menos primer y el segundo polipéptido progenitor comprenden cada uno un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, donde el método comprende introducir en el al menos primer y/o segundo polipéptido progenitor una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

40 En una divulgación, el método comprende introducir en el al menos primer y/o segundo polipéptido progenitor una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

45 En otra divulgación, el método comprende introducir en el al menos primer y/o segundo polipéptido progenitor una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, el método comprende la introducción de una mutación que puede ser la misma o diferente tanto en el primer como en el segundo polipéptido progenitor.

En otra divulgación, el método comprende

50 (i) introducir una mutación en el primer polipéptido progenitor en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana,

(ii) proporcionar el segundo polipéptido progenitor que no comprenda una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, el método comprende introducir en el primer polipéptido progenitor una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, o E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

5 En otra divulgación, la mutación en una o más posiciones es distinta de S440Y y S440W, y en la que el método comprende además los pasos de

(i) introducir en el primer polipéptido progenitor una segunda mutación en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y

10 (ii) introducir en el segundo polipéptido progenitor una segunda mutación en el residuo de aminoácido correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación no sea S440Y o S440W; en donde los pasos (i) y (ii) pueden ser alternativamente

(iii) introducir en el primer polipéptido progenitor una segunda mutación en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación no sea S440Y o S440W;

15 (iv) introducir en el segundo polipéptido progenitor una segunda mutación en el residuo de aminoácido correspondiente a la posición K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

El segundo polipéptido progenitor puede ser cualquier polipéptido progenitor que por sí mismo no proporcione una respuesta CDC suficiente al unirse a la célula diana.

20 Por lo tanto, sin estar limitado por la teoría, se cree que dicho método de proporcionar un primer polipéptido variante que comprende una mutación en uno o más residuos de aminoácidos según la lista anterior y por lo tanto cuyo polipéptido variante tiene una respuesta CDC aumentada, y proporcionar un segundo polipéptido variante que no comprende dichas mutaciones se obtiene una respuesta CDC del segundo polipéptido progenitor.

25 El método de combinar un primer anticuerpo que comprende una de dichas mutaciones capaces de aumentar la CDC con un segundo anticuerpo que no está modificado de acuerdo con la invención, como se muestra en el Ejemplo 31 da como resultado un aumento de la CDC de la combinación. Así, este método puede en una divulgación usarse para combinar un anticuerpo terapéutico, como el segundo anticuerpo, que ha demostrado ser seguro pero no suficientemente eficaz (o para el que es deseable una eficacia aumentada) con un primer anticuerpo que comprende una mutación, y de este modo dar como resultado una combinación que sea eficaz.

30 Ejemplos de segundos anticuerpos adecuados que no comprenden una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado de los correspondientes a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, incluyen pero no se limitan a cualquiera de los siguientes; (90Y) clivatuzumab tetraxetan; (90Y) tacatuzumab tetraxetan; (99mTc) fanolesomab; (99mTc) nofetumomab Merpentan; (99mTc) pintumomab; 3F8; 8H9; abagovomab; abatacept; abciximab; Actoxumab; adalimumab; adecatumumab; afelimomab; aflibercept; Afutuzumab; alacizumab pegol; albiglutida; ALD518; alefacept; alemtuzumab; Alirocumab; altumomab; Altumomab pentetato; alvircept sudotox; amatuximab; AMG714/HuMax-IL15; 35 anatumomab mafenatox; Anrukinzumab (= IMA-638); apolizumab; arcitumomab; aselizumab; atacicept; atinumab; Atlizumab (= tocilizumab); atorolimumab; baminercept; Bapineuzumab; basiliximab; bavituximab; bectumomab; belatacept; belimumab; benralizumab; bertilimumab; besilesomab; bevacizumab; bezlotoxumab; biciromab; bifarcept; bivatumab; bivatuzumab mertansina; blinatumomab; blosozumab; brentuximab vedotin; briakinumab; briobacept; brodalumab; canakinumab; cantuzumab mertansina; cantuzumab ravtansina; caplacizumab; capromab; Capromab pendetida; carlumab; catumaxomab; CC49; cedelizumab; certolizumab pegol; cetuximab; Ch.14.18; citatuzumab bogatox; cixutumumab; Clazakizumab; clenoliximab; Clivatuzumab tetraxetan; conatumumab; conbercept; CR6261; crenezumab; dacetuzumab; daclizumab; dalantercept; dalotuzumab; daratumumab; Demcizumab; denosumab; Detumomab; Dorlimomab aritox; drozitumab; dulaglutida; ecomeximab; ecilizumab; edobacomab; edrecolomab; 40 efalizumab; efungumab; elotuzumab; elsilimumab; enavatuzumab; enlimomab; enlimomab pegol; enokizumab; ensituximab; epitumomab; epitumomab cituxetan; epratuzumab; erlizumab; ertumaxomab; etanercept; etaracizumab; etrolizumab; exbivirumab; Fanolesomab; faralimumab; farletuzumab; Fasinumab; FBTA05; felvizumab; Fezakinumab; ficlatuzumab; figitumumab; flanvolumab; fontolizumab; foralumab; foravirumab; fresolimumab; fulranumab; galiximab; ganitumab; gantenerumab; gavilimumab; gemtuzumab; Gemtuzumab ozogamicina; gevokizumab; girentuximab; glembatumumab; Glembatumumab vedotin; golimumab; Gomiliximab; GS6624; anticuerpos anti-CD74; anticuerpos 45 anti-cMet según se describen en WO 2011/110642; anticuerpos anti-Her2 según se describen en WO 2011/147986 o WO 2011/147982; anticuerpos anti-IL8 según se describen en WO 2004/058797; anticuerpos anti-TAC según se describen en WO 2004/045512; anticuerpos anti-factor tisular (TF) según se describen en WO 2010/066803 o WO 2011/157741; ibalizumab; ibritumomab tiuxetan; icrucumab; igovomab; Imciromab; inclacumab; indatuximab ravtansine; infliximab; inolimumab; inotuzumab ozogamicina; intetumumab; yodo (124I) girentuximab; ipilimumab; 50 iratumumab; itolizumab; ixekizumab; keliximab; labetuzumab; lebrikizumab; lemalesomab; lenercept; lerdelimomab; lexatumumab; libivirumab; lintuzumab; lorvotuzumab mertansine; lucatumumab; lumiliximab; mapatumumab; maslimomab; matuzumab; mavrilimumab; mepolizumab; metelimomab; milatuzumab; minretumomab; mirococept; mitumomab; mogamulizumab; morolimumab; motavizumab; moxetumomab; pasudotox; muromonab-CD3; nacolomab

tafenatox; namilumab; naptumomab estafenatox; narnatumab; natalizumab; nebacumab; necitumumab; nerelimumab; nimotuzumab; Nivolumab; Nofetumomab; merpentan; obinutuzumab; ocaratuzumab; ocrelizumab; odulimumab; ofatumumab; olaratumab; olokizumab; omalizumab; onartuzumab; onercept; oportuzumab monatox; oregovomab; orelizumab; oxelumab; ozoralizumab; pagibaximab; palivizumab; panitumumab; panobacumab; pascolizumab; pateclizumab; patritumab; pegsunercept; Pentumomab; pertuzumab; pexelizumab; Pintumomab; Placulumab; ponezumab; priliximab; primumab; PRO 140; quilizumab; racotumomab; radretumab; rafivirumab; ramucirumab; ranibizumab; raxibacumab; regavirumab; reslizumab; RG1507/HuMax-IGF1R; RG1512/HuMax-pSelectin; rilonacept; rilotumumab; rituximab; robatumumab; roledumab; romosozumab; rontalizumab; rovelizumab; ruplizumab; samalizumab; sarilumab; satumomab; Satumomab pendetide; secukinumab; sevirumab; sibrotuzumab; sifalimumab; siltuximab; siplizumab; sirukumab; solanezumab; solitomab; Sonepcizumab; sontuzumab; sotatercept; stamulumab; sulesomab; suvizumab; tabalumab; Tacatuzumab tetraxetan; tadocizumab; talizumab; tanezumab; taplitumomab paptox; tefibazumab; telimumab aritox; tenatumomab; teneliximab; teplizumab; teprotumumab; TGN1412; Ticilimumab (= tremelimumab); tigatuzumab; TNX-650; Tocilizumab (= atlizumab); toralizumab; toraprel; tositumomab; tralokinumab; trastuzumab; trastuzumab emtansina; TRBS07; trebananib; tregalizumab; tremelimumab; tucotuzumab celmoleukin; tuvirumab; ublituximab; urelumab; urtoxazumab; ustekinumab; vapaliximab; vatelizumab; vedolizumab; veltuzumab; vepalimumab; vesencumab; visilizumab; volociximab; Vorsetuzumab mafodotin; votumumab; zalutumumab; zanolimumab; ziralimumab; y zolimumab aritox.

Los anticuerpos de primera y segunda variante tendrán preferencia para la oligomerización entre sí en comparación con cualquier anticuerpo de tipo silvestre o de origen natural como se muestra en el Ejemplo 10.

En una divulgación, la mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es K439D/E, y/o la mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es S440K/R.

De este modo, el aumento de la especificidad es con respecto a la "inducción de CDC". Por lo tanto, dicho método es, en una divulgación, un método para aumentar la especificidad de la inducción de una función efectora mediante una combinación de al menos un primer y un segundo polipéptido progenitor.

Al realizar el método de aumento de la especificidad, o especificidad de inducción de una función efectora, mediante una combinación de al menos un primer y un segundo polipéptido progenitor, se obtiene una combinación de una primera variante y una segunda variante de polipéptido.

Al introducir una mutación en K439 o S440 de un polipéptido progenitor, el polipéptido variante así obtenido tiene una función efectora disminuida en comparación con el polipéptido progenitor. Sin embargo, como también se describe en otras partes del presente documento, la mutación en K439 y S440 son capaces de complementarse entre sí o restaurar la función efectora de un polipéptido que comprende ambas mutaciones. Esta capacidad de las mutaciones en K439 y S440 para complementarse entre sí puede utilizarse de forma similar en dos polipéptidos. Así, cuando una mutación en K439 se introduce en un primer polipéptido progenitor y una mutación en S440 se introduce en un segundo polipéptido progenitor, o *viceversa*, la disminución de la función efectora ya no se observa cuando el primer y el segundo polipéptido variante se utilizan en combinación. El término "especificidad creciente" o "especificidad mejorada" se refiere en este contexto al hecho de que una respuesta efectora inducida por una combinación de un primer polipéptido variante que comprende una mutación en K439 y un segundo polipéptido variante que comprende una mutación en S440 es mayor que la respuesta efectora inducida por el primer polipéptido variante que comprende una mutación en K439 o el segundo polipéptido variante que comprende una mutación en S440.

Mediante la introducción de una sustitución de aminoácidos tanto en un K439 como en un S440 se aumenta la especificidad de la oligomerización.

Cuando se combinan las mutaciones de posición K439 y/o S440 con la primera mutación, se obtiene una mejora de la CDC y se aumenta la especificidad de la CDC.

En una divulgación, el al menos el primer y el segundo polipéptidos progenitores se unen al mismo sitio de unión o, con respecto a los anticuerpos, al mismo epítipo.

En una divulgación, el al menos el primer y el segundo polipéptidos progenitores se unen a diferentes sitios de unión en la misma diana o, con respecto a los anticuerpos, a diferentes epítipos en el mismo antígeno.

En una divulgación, el al menos el primer y segundo polipéptidos progenitores se unen a diferentes epítipos en diferentes dianas.

En una divulgación, el primer y segundo polipéptidos progenitores son el primer y segundo anticuerpos progenitores, que tienen las mismas o diferentes secuencias VL y VH.

En una divulgación, la combinación de al menos un primer y un segundo polipéptido progenitor comprende un primer polipéptido progenitor y un segundo polipéptido.

En una divulgación, la especificidad aumenta cuando una combinación del primer y segundo polipéptido progenitor se une a su sitio de unión o antígeno en una célula que expresa antígeno, en una membrana celular o en un virión.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere al uso de una mutación en dos o más residuos de aminoácidos de un polipéptido para aumentar la especificidad de, por ejemplo, CDC inducido por, el polipéptido cuando se une a su antígeno en una célula que expresa antígeno, en una membrana celular o en un virión, en el que

una primera mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana;

una segunda mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, el primer y segundo polipéptido progenitor es un primer y segundo anticuerpo progenitor que comprende cada uno un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En una divulgación, el primer y segundo anticuerpo progenitores es un anticuerpo monoespecífico, biespecífico o multiespecífico.

En una divulgación, el primer y/o segundo anticuerpo progenitor es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una primera región de unión a antígeno, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región CH2-CH3 y una segunda región de unión a antígeno, en el que la primera y la segunda regiones de unión a antígeno se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y en el que dicha primera región CH2-CH3 comprende una mutación aminoacídica adicional en una posición seleccionada entre las correspondientes a K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la segunda región CH2-CH3 comprende una mutación adicional de aminoácidos en una posición seleccionada de entre las correspondientes a F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en la que la mutación adicional de aminoácidos en la primera región CH2-CH3 es diferente de la mutación adicional de aminoácidos en la segunda región CH2-CH3.

En una divulgación preferida, la primera región CH2-CH3 comprende una mutación de aminoácido adicional en la posición correspondiente a K409, tal como K409R, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la segunda región CH2-CH3 comprende una mutación de aminoácido adicional en la posición correspondiente a F405, tal como F405L, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

Realizando este método se obtiene una combinación de al menos un primer y segundo anticuerpo variante. El al menos primer y segundo anticuerpo variante obtenidos por este método tienen cuando se combinan una CDC aumentada en comparación con una combinación del primer y segundo anticuerpo progenitor.

El término "CDC aumentado" debe entenderse tal como se describe en el presente documento.

El primer y/o segundo anticuerpo progenitor puede ser cualquier anticuerpo progenitor descrito en el presente documento.

Los métodos de aumento de la CDC de una combinación de un primer y segundo anticuerpo pueden realizarse en particular para obtener un primer y/o segundo anticuerpo variante que tenga cualquiera de las características de un anticuerpo variante según se describe en el presente documento.

En una divulgación, el al menos el primer y el segundo anticuerpos progenitores se unen al mismo epítipo.

En una divulgación, el al menos el primer y el segundo anticuerpos progenitores se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno.

En una divulgación, al menos el primer y segundo anticuerpos progenitores se unen a diferentes epítopos en diferentes dianas.

En una divulgación, el primer y segundo anticuerpo progenitores tienen las mismas o diferentes secuencias VL y VH.

En una divulgación, la combinación de al menos un primer y un segundo anticuerpo progenitor comprende un primer anticuerpo progenitor y un segundo anticuerpo.

En una divulgación, la combinación de al menos un primer y un segundo anticuerpo progenitor comprende otros anticuerpos progenitores, como un tercer, cuarto o quinto anticuerpo progenitor.

En una divulgación, el primer y segundo anticuerpos progenitores biespecíficos o multiespecíficos son el mismo o diferente anticuerpo. En una divulgación, el primer y segundo anticuerpos progenitores biespecíficos o multiespecíficos se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno o de antígenos diferentes. Por lo tanto, en una divulgación, dichos

menos primero y segundo anticuerpos progenitores biespecíficos o multiespecíficos que se unen a diferentes epítomos en el mismo antígeno o en antígenos diferentes.

En una divulgación de los métodos y/o usos de la presente invención el anticuerpo progenitor, ya sea un anticuerpo progenitor, un primer anticuerpo progenitor o un segundo anticuerpo progenitor, puede contener otras mutaciones distintas de las de la presente invención que se ha descubierto que afectan a una función efectora. Tales otras mutaciones pueden introducirse al mismo tiempo que las mutaciones de la presente invención que afectan a una función efectora o pueden introducirse secuencialmente, los métodos o usos de la presente invención no se limitan a la introducción simultánea o secuencial de mutaciones. El anticuerpo biespecífico puede ser cualquier anticuerpo biespecífico y los métodos y usos de la presente invención no se limitan a ningún formato biespecífico particular, ya que se prevé que puedan utilizarse diferentes formatos.

En una divulgación, el método no altera la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor.

En una divulgación, el método no altera la unión del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor al receptor Fc neonatal (FcRn) según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 34.

En una divulgación, el método no aumenta ni disminuye la unión del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor al receptor Fc neonatal (FcRn) en más del 30%, tal como de más del 20%, 10% o 5% según se mide por un cambio en la absorbancia a OD405 nm según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 34.

En una divulgación, el método no aumenta la afinidad aparente del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor al receptor Fc neonatal de ratón (FcRn) en más de un factor 0.5 o no disminuye la afinidad aparente del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor al FcRn de ratón en más de un factor 2 según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 34.

En una divulgación, el método no altera la tasa de depuración plasmática del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 37.

En una divulgación, el método no aumenta ni disminuye la tasa de depuración plasmática del polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor en más de un factor 3.0, tal como más de un factor 2.5, factor 2.0, factor 1.5 o factor 1.2, tal como se determina por el método divulgado en el Ejemplo 37.

En una divulgación, el método no altera la activación del complemento de la fase fluida independiente de la diana de la variante como se determina por el método como se determina por el método divulgado en el Ejemplo 36.

En una divulgación, el método no altera la semivida plasmática del polipéptido progenitor o del anticuerpo progenitor.

Cualquiera de las mutaciones o combinaciones de las mismas aquí descritas puede introducirse de acuerdo con un método de la presente invención.

Las mutaciones seleccionadas de las sustituciones de aminoácidos de ejemplo o preferidas pueden probarse en ensayos apropiados que permitan la formación de oligómeros de anticuerpos unidos a antígeno y detecten una mayor unión a C1q, activación del complemento, CDC, ADCC y/o internalización, como los descritos en los Ejemplos. Por ejemplo, la avidéz de unión a C1q puede determinarse según un ensayo similar al descrito en el Ejemplo 4, usando células que expresan el antígeno para la variante de anticuerpo. En los Ejemplos 5, 6, 10, 16, 19, 22, 23, 24, 25 y 35 se proporcionan ensayos CDC de ejemplo. En el Ejemplo 12 se proporciona un ensayo ADCC de ejemplo. En el Ejemplo 26 se proporciona un ensayo de internalización de ejemplo. Por último, para discriminar entre mutaciones en residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión a C1q de mutaciones que afectan a la formación de oligómeros, la unión a C1q en un ensayo ELISA según, por ejemplo, el Ejemplo 3 puede compararse con la unión a C1q en un ensayo basado en células según, por ejemplo, el Ejemplo 4, las tasas de depuración plasmática pueden compararse según el ensayo descrito en el Ejemplo 37, la comparación de la unión de FcRn según el Ejemplo 34, y la activación del complemento en fase fluida independiente de la diana puede evaluarse según el ensayo del Ejemplo 36.

En una divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos, una delección de aminoácidos o una inserción de aminoácidos.

En una divulgación la mutación en uno o más residuos de aminoácidos es una delección de aminoácido.

En una divulgación la mutación en uno o más residuos de aminoácidos es una inserción de aminoácido.

En una divulgación particular la mutación en uno o más residuos de aminoácidos es una sustitución de aminoácido.

En una divulgación, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos puede seleccionarse de cualquiera de las sustituciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1.

Así, en una divulgación E345X puede ser E345R, Q, N, K, Y, A, C, D, F, G, H, I, L, M, P, S, T, V, W, o Y; en particular E345A, D, G, H, K, N, Q, R, S, T, Y o W, o más particularmente E345D, K, N, Q, R, o W; o aún más particularmente E345R, Q, N, K, o Y. En otra divulgación preferida, E345X es E345K o E345Q.

5 En otra divulgación adicional, E430X puede ser E430T, S, G, F, H, A, C, D, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, o Y; en particular E430T, S, G, F, o H. En otra divulgación preferida, E430X es E430G o E430S. En otra divulgación, la mutación no se encuentra en un residuo de aminoácido directamente implicado en la unión a C1q, opcionalmente según se determina comparando la unión a C1q en un ensayo ELISA según el Ejemplo 3 con la unión a C1q en un ensayo basado en células según el Ejemplo 4.

10 En una divulgación, la una o más mutaciones es una mutación, es decir, no se introduce más de una mutación en el anticuerpo progenitor.

En otra divulgación, el método o uso de acuerdo con la presente invención comprende introducir una mutación en al menos dos, tales como dos, tres, cuatro, cinco, o más de los residuos de aminoácidos de la Tabla 1.

Cualquiera de las combinaciones de mutaciones aquí descritas puede introducirse de acuerdo con un método de la presente invención.

15 En una divulgación, el método comprende introducir en el polipéptido progenitor más de una mutación, tal como dos, tres, cuatro o cinco, en particular dos o tres mutaciones en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E345X, E430X, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana. Por ejemplo, al menos más de uno de los residuos de aminoácidos correspondientes a E345X, E430X, S440Y, y S440W en la
20 región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, puede mutarse, tal como dos o todos de E345X, E430X, S440Y, y S440W, opcionalmente en combinación con una mutación en uno o más de los otros aminoácidos enumerados en la Tabla 1. Las al menos dos mutaciones pueden ser cualquier sustitución de residuo de aminoácido de la posición E345 en combinación con cualquier sustitución de residuo de aminoácido de la posición E430 o S440Y o S440W, o pueden ser cualquier sustitución de aminoácido de la posición E430 en combinación con cualquier residuo de aminoácido de la posición S440Y o S440W. En otra divulgación, las dos o tres mutaciones se introducen en el anticuerpo progenitor
25 en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

Tal combinación de dos mutaciones en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E345X/E430X, E345X/S440Y, E345X/S440W, E430X/S440Y, y E430X/S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

30 En los métodos o usos de acuerdo con la presente invención, la CDC aumenta cuando el anticuerpo se une a su antígeno.

Sin estar limitado a ninguna teoría, se cree que la CDC aumenta cuando el anticuerpo está unido a su antígeno, en el que el antígeno se encuentra en una célula que expresa antígeno, membrana celular o virión. En una divulgación, la región Fc de una cadena pesada de IgG1 comprende la secuencia de residuos 130 a 330 de SEQ ID NO:1.

35 El polipéptido progenitor o el anticuerpo progenitor puede ser cualquier polipéptido progenitor o cualquier anticuerpo progenitor como se describe en el presente documento. En este contexto, los polipéptidos y anticuerpos progenitores se refieren también a los primeros y segundos polipéptidos progenitores y a los primeros y segundos anticuerpos progenitores.

40 En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM o IgE.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo humano de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.

45 En una divulgación, el anticuerpo progenitor, el primer anticuerpo progenitor y el segundo anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG1 humano, por ejemplo, el alotipo IgG1m(za) o IgG1m(f), que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:1 o 5.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG2 humano, que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:2.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG3 humano, que opcionalmente comprende una región Fc que comprende SEQ ID NO:3.

50 En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG4 humano, que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:4.

En una realización, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo biespecífico.

En una realización, el anticuerpo progenitor es cualquier anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo que comprende al menos parte de una región Fc, anticuerpos monovalentes (descritos en WO2007059782 por Genmab); anticuerpos de cadena pesada, que constan únicamente de dos cadenas pesadas y se encuentran de forma natural en, por ejemplo, camélidos (por ejemplo, Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), dominio diseñado por intercambio de hebras (anticuerpo SEED o Seed) que son moléculas asimétricas y biespecíficas similares a anticuerpos (Merck, WO2007110205); Triomab (Fresenius, Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219); FcΔAdp (Regeneron, WO2010151792), Andamio azimétrico (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Inmunoglobulina de doble dominio variable (Abbott, DVD-Ig, Patente U.S. No. 7,612,181); Anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diabody (ImClone/Eli Lilly), Formatos de anticuerpos de botones en ojal (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); Formatos de anticuerpos de dirección electrostática. (Amgen, EP1870459 and WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304A2); IgG1 e IgG2 biespecíficos (Rinat neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus), Anticuerpos de dominio de doble direccionamiento (GSK/Domantis), Anticuerpos dos en uno que reconocen dos dianas (Genentech, NovImmune), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), CovX-body (CovX/Pfizer), Biespecífico tipo IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74), y DIG-body and PIG-body (Pharmabcine), y Moléculas de redireccionamiento de doble afinidad (Fc-DART o Ig-DART, de MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), Zybodies (Zyngenia), enfoques con cadena ligera común (Crucell/ Merus, US7262028) o cadenas pesadas comunes (κλBodies de NovImmune), así como proteínas de fusión que comprenden una secuencia polipeptídica fusionada a un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio Fc, como las fusiones scFv, como BsAb de ZymoGenetics/BMS), HERCULES de Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS de Emergent BioSolutions/Trubion, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), fusión scFv de Novartis, fusión scFv de Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb de Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² de f-Star (WO2008/003116), y fusiones scFv duales. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (tal como anticuerpos monoclonales humanos), mezclas de anticuerpos (policlonales recombinantes) por ejemplo generados por tecnologías explotadas por Symphogen y Merus (Oligoclomics), y polipéptidos similares a anticuerpos, como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer potencialmente cualquier isotipo.

En otra realización, el antígeno se expresa en la superficie de una célula.

En otra realización, la célula es una célula tumoral humana.

En otra realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína envoltante de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFvIII, IGFr, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3.

En otra realización, el antígeno está asociado a una membrana celular.

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

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, que se une opcionalmente al menos a un antígeno seleccionado entre CD20 y CD38.

En otra realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo que al menos uno de 7D8 y 005, comprendiendo opcionalmente una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable de al menos uno de 7D8 y 005.

En cualquier uso de acuerdo con la invención divulgada, el anticuerpo sin mutaciones de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo progenitor. Por lo tanto, los usos aquí descritos prevén cualquier variante de dichos anticuerpos progenitores.

En una realización, la función efectora es la unión a receptores Fc, por ejemplo, incluyendo la unión a receptores Fc-gamma.

En una realización, la función efectora es la internalización del polipéptido que contiene Fc.

En una realización, la función efectora es una combinación de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

Tal como se usa en el presente documento, el término "unión a C1q", cuando se usa en el contexto de una variante o anticuerpo de un anticuerpo progenitor incluye cualquier mecanismo del primer componente en la vía clásica de activación del complemento mediado por la unión de la variante o anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (tales como células efectoras). La unión a C1q de un anticuerpo puede evaluarse mediante un ELISA (tal como, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q utilizado en los Ejemplos 3 y 4), o la eficacia de C1q puede evaluarse mediante un ensayo CDC (tal como, por ejemplo, el ensayo CDC utilizado en el

Ejemplo 5). En otra realización, la avidéz de unión a C1q del anticuerpo se determina según el ensayo descrito en el Ejemplo 4.

En todos los métodos de acuerdo con la invención divulgada, el anticuerpo sin mutaciones de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo progenitor. Por lo tanto, los métodos aquí descritos prevén cualquier variante de dichos anticuerpos progenitores.

El anticuerpo progenitor, el primer anticuerpo progenitor, el segundo anticuerpo progenitor, o las variantes de los mismos obtenidos por los métodos y/o usos de la presente invención pueden unirse a cualquier diana como se describe en el presente documento.

Ejemplos de antígenos o dianas contra los que puede dirigirse la invención son: 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM17; AFP; AXL; ANGPT2 antígeno de ántrax; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; antígeno asociado a carcinoma CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; Claudin4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; Cripto; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; Receptor de endotelina B; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP alfa; Fc gamma RI; FCER2; FGFR3; cadena beta de la fibrina II; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; gangliósido GD3; GDF2; GLP1R; Glypican-3; GPNMB; HBV (virus de la hepatitis B); HCMV (citomegalovirus humano); homólogo de la proteína de choque térmico 90 [*Candida albicans*]; glicoproteína gD del virus del herpes simple; HGF; VIH-1; VIH-1 IIIB gp120 bucle V3; HLA-DRB (HLA-DR beta); virus respiratorio sincitial humano, glicoproteína F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 biespecífico; IgE Fc; IGF1R; región de conexión IGHE; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; subunidad beta del receptor de interleucina 2; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; Lewis-y; lípido A, dominio del lipopolisacárido LPS; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; antígeno de células granulocíticas NCA-90; Nectina 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; fosfatidilserina; PTK-7; *Pseudomonas aeruginosa* serotipo IATS O11; RSV (virus respiratorio sincitial humano, glicoproteína F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; subunidad B de la toxina tipo Shiga II [*Escherichia coli*]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; ácido lipoteico de *Staphylococcus epidermidis*; receptor de células T alfa_beta; TF; TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; y Vimentina.

En el aspecto principal, la presente invención se refiere a un método de inducción de CDC contra una célula, membrana celular o virión que expresa una diana ex vivo a la que se une un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, que comprende

(i) proporcionar un polipéptido progenitor o una combinación de al menos un primer polipéptido progenitor y un segundo polipéptido progenitor que haya sido mutado según una cualquiera de las realizaciones aquí divulgadas; y

(ii) poner en contacto una preparación del polipéptido progenitor mutado del paso i) o la combinación mutada de al menos un primer polipéptido progenitor y un segundo polipéptido progenitor del paso i) con la célula, la membrana celular o el virión que exprese un antígeno en presencia de complemento humano o de una célula efectora.

En una realización, cualquiera o todos los polipéptidos progenitores, el primer polipéptido progenitor y el segundo polipéptido progenitor pueden ser un anticuerpo.

En otra divulgación, el método aumenta una respuesta efectora adicional seleccionada de ADCC, unión al receptor Fc-gamma, unión a la Proteína A, unión a la proteína G, ADCP, citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), citotoxicidad potenciada por el complemento, unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado mediada por el anticuerpo, y cualquier combinación de las mismas.

En otra divulgación, el método también induce citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

En otra divulgación más, el método también induce la internalización del polipéptido que contiene Fc.

En una realización, la célula es una célula tumoral humana o una célula bacteriana.

En otra realización, el anticuerpo IgG1 progenitor es un anticuerpo IgG1 humano.

En otra realización, el primer y segundo antígenos se seleccionan por separado del grupo que consiste en erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, proteína envoltante de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFvIII, IGFv, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), EpCAM y MRP3.

En otra realización, el primero y segundo anticuerpos progenitores son totalmente humanos, opcionalmente en los que los primero y segundo anticuerpos progenitores se unen a antígenos seleccionados por separado de CD20 y CD38.

En otra realización, el primer y segundo anticuerpos progenitores se seleccionan por separado entre 7D8 y 005.

En una incluso realización adicional, la célula es una célula bacteriana.

En otra realización, la célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en *S. aureus*, *S. Epidermidis*, *S. pneumonia*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *S. typhimurium*, *Neisseria meningitides* y *Mycobacterium tuberculosis*.

- 5 En otra realización, el primer y/o segundo antígeno es ácido lipoteicoico (LTA), opcionalmente en el que al menos uno del primer y segundo anticuerpo progenitores es pagibaximab.

En otra realización, el antígeno se expresa en un virión.

En otra realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen al mismo antígeno.

- 10 En otra realización, el primer y segundo anticuerpos comprenden la misma secuencia VH, secuencia VL, o ambas secuencias VH y VL.

- 15 A los efectos de la presente invención, la célula diana que expresa o está asociada de otro modo con un antígeno puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Células de ejemplo que expresan antígeno incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, particularmente células humanas, tales como células cancerosas humanas; y organismos unicelulares tales como bacterias, protozoos y hongos unicelulares tales como células de levadura. Las membranas celulares que comprenden o están asociadas de otro modo con un antígeno incluyen membranas celulares parciales y/o alteradas derivadas de una célula que expresa el antígeno. Un antígeno asociado con un virión o a una partícula vírica puede estar incluido comprendido o de otro modo asociado con la cubierta proteica y/o en la envoltura lipídica del virión.

- 20 La célula diana puede ser, por ejemplo, una célula tumoral humana. Los antígenos tumorales adecuados incluyen cualquier diana o antígeno descrito en el presente documento, pero no se limitan a, erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, proteína envolvente de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFvIII, IGFR, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), EpCAM y MRP3. Los antígenos preferidos incluyen CD20, CD38, HER2, EGFR, IGFR, CD25, CD74 y CD32. Los anticuerpos de ejemplo incluyen el anticuerpo anti-CD20 7D8 como se divulga en WO 2004/035607, el anticuerpo anti-CD38 005 divulgado en WO 06/099875, el anticuerpo anti-CD20 11B8 como se divulga en WO 2004/035607, el anticuerpo anti-CD38 003 como se divulga en WO 06/099875, el anticuerpo anti-EGFr 2F8 como se divulga en WO 02/100348. En el presente documento se proporcionan ejemplos de otros anticuerpos particulares.

- 25 Alternativamente, la célula diana puede ser una célula bacteriana, tal como, por ejemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumonia*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *S. typhimurium*, *Neisseria meningitides* y *Mycobacterium tuberculosis*. Los antígenos de ejemplo incluyen el ácido lipoteicoico (LTA), y los anticuerpos de ejemplo incluyen el pagibaximab.

- 30 Alternativamente, la diana puede estar presente en la superficie de un virus, célula fúngica u otra partícula, como, por ejemplo, el virus del Nilo Occidental, el virus del Dengue, el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del papiloma humano, el virus de Epstein-Barr, los herpesvirus, los poxvirus, el virus de la gripe aviar, el RVS, *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*.

En una realización, el paso de contacto (ii) tiene lugar *in vitro*.

En una divulgación, el paso de contacto (ii) tiene lugar *in vivo*.

En otra divulgación, el paso (ii) comprende administrar las variantes a un sujeto.

- 40 En otra realización, el sujeto padece cáncer, una infección bacteriana o una infección vírica. El paso de contacto (ii) de las divulgaciones antes mencionadas puede tener lugar *in vitro* o *in vivo*. En este último caso, el paso (ii) puede comprender además la administración del preparado o preparados a un sujeto, opcionalmente un sujeto que padezca cáncer o una infección bacteriana. A continuación se proporcionan más detalles sobre las aplicaciones terapéuticas.

El primer y el segundo anticuerpos comprenden regiones de unión a antígeno que pueden unirse al mismo epítipo o a epítopos diferentes. Dichos epítopos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes.

- 45 En una realización, el primer y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítopos en diferentes dianas. Dichas dianas pueden expresarse en la misma célula o tipo celular, o pueden expresarse en diferentes células o tipos celulares. En una realización de este tipo, la mejora de una función efectora se dirige únicamente a las células o tipos celulares que expresan ambas dianas, y de este modo se reducen los riesgos de cualquier daño colateral de células o tipos celulares que no son la causa de una enfermedad a tratar.

- 50 Sin estar limitado por ninguna teoría, se cree que la mejora de la CDC puede restringirse a las células diana que expresan dos dianas/antígenos específicos simultáneamente siempre que el primer y el segundo anticuerpo se unan a epítopos que se encuentran en la misma célula, explotando así la expresión combinada de dianas para mejorar la selectividad de la inducción de CDC mejorada.

En los casos en que las dianas se expresan en diferentes células o tipos celulares, se cree sin estar limitado por la teoría, que la administración en cualquier orden del primer y segundo anticuerpo mejorará el aumento de CDC y posiblemente también otras funciones efectoras por "reclutamiento" de una segunda célula o tipo celular que expresa la segunda diana.

- 5 En una divulgación en la que se utiliza una combinación de un primer y segundo anticuerpo, el paso (ii) puede realizarse contactando la célula simultáneamente, por separado o secuencialmente con el primer y segundo anticuerpos progenitores mutados en presencia de complemento humano y/o una célula efectora.

La invención también proporciona un método para inducir una CDC u otra respuesta efectora, tal como ADCC, contra una célula diana, membrana celular, virión u otra partícula asociada con un antígeno al que se une un anticuerpo IgG1 o IgG3, que comprende los pasos de (i) proporcionar una variante del anticuerpo que comprende una mutación en K439 que es K439E y una mutación en S440 que es S440K o S440R en la región Fc del anticuerpo; y (ii) poner en contacto una preparación de la variante con la célula en presencia de complemento humano y/o una célula efectora

10 La invención también proporciona un método para inducir una respuesta CDC u otro efector, tal como ADCC, contra una célula diana, membrana celular o virión que expresa un primer antígeno al que se une un primer anticuerpo IgG1 y un segundo antígeno al que se une un segundo anticuerpo, que comprende los pasos de (i) proporcionar una primera variante que es el primer anticuerpo que comprende una mutación K439E y una segunda variante que es el segundo anticuerpo que comprende una mutación S440K o S440R; y (ii) simultánea, separada o secuencialmente poner en contacto la célula con preparaciones de la primera y segunda variantes en presencia de complemento humano o una célula efectora.

- 15 En realizaciones separadas y específicas, el primer y segundo anticuerpos se unen a (i) antígenos diferentes; (ii) epítomos diferentes en el mismo antígeno, (iii) el mismo epítomo en un antígeno, y (iv) el mismo epítomo en un antígeno y comprenden las mismas secuencias VH y/o VL.

Otros métodos

25 También se divulga en el presente documento un método para identificar una mutación en un anticuerpo que mejora la función efectora del anticuerpo para unirse a C1q, que comprende los pasos de

(i) preparar al menos un anticuerpo que comprenda una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana;

(ii) evaluar la actividad C1q del anticuerpo cuando se une a la superficie de la célula que expresa el antígeno en comparación con el anticuerpo progenitor; y

- 30 (iii) seleccionar la mutación de cualquier variante que presente una mayor aversión a C1q.

En una divulgación, el al menos un anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W, tal como E430G, E430S, E345K y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

35 En otro aspecto principal, la invención se refiere a un método de identificación de una mutación en un anticuerpo progenitor que aumenta la capacidad del anticuerpo para inducir una respuesta CDC, que comprende los pasos de

(i) preparar al menos una variante del anticuerpo progenitor que comprenda una mutación en uno o más aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, o S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana;

- 40 (ii) evaluar la respuesta CDC inducida por la variante cuando se une a la superficie de una célula que expresa antígeno, en presencia de células efectoras o complemento, en comparación con el anticuerpo progenitor; y

(iii) seleccionar la mutación de cualquier variante que tenga una respuesta CDC aumentada.

45 En una divulgación, el al menos un anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, tal como E430G, E430S, E345K y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

Polipéptidos de la presente invención

Polipéptidos progenitores

50 Como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere, *inter alia*, a variantes de polipéptidos progenitores que comprenden una o más mutaciones en la región CH3 de una inmunoglobulina, por ejemplo, en el anticuerpo la cadena pesada. Los "polipéptidos progenitores" pueden ser "anticuerpos progenitores". Los anticuerpos "progenitores", que pueden ser anticuerpos de tipo silvestre, que se utilizarán como material de partida de la presente

invención antes de la modificación pueden, por ejemplo, producirse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), o pueden producirse por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos fago utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., Nature 352, 624 628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 597 (1991). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o mamíferos no humanos como conejos, ratas, perros, primates, etc.

Los anticuerpos progenitores pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcrómicos, por ejemplo ratones HuMAb, portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. El ratón HuMAb contiene un minilocus genético de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera (κ) no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994)). En consecuencia, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos, sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995) y Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe detalladamente en Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996). Véase también US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden utilizarse para generar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas.

Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención de otras especies pueden identificarse mediante tecnologías de tipo visualización, incluyendo, sin limitación, visualización de fagos, visualización retroviral, visualización ribosomal, visualización de mamíferos, visualización de levadura y otras técnicas conocidas en la técnica, y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales técnicas son bien conocidas en la técnica. Una estrategia particular, descrita en el Ejemplo 17, puede aplicarse a cualquier anticuerpo para preparar y obtener una variante de la invención usando visualización de fagos.

El anticuerpo progenitor no se limita a anticuerpos que tienen un dominio Fc natural, por ejemplo humano, sino que también puede ser un anticuerpo que tenga otras mutaciones que las de la presente invención, como por ejemplo mutaciones que afectan a la glicosilación o que permiten que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico. Por "anticuerpo natural" se entiende cualquier anticuerpo que no contenga ninguna mutación introducida genéticamente. Un anticuerpo que contiene modificaciones naturales, por ejemplo, diferentes alotipos, debe entenderse como un "anticuerpo natural" en el sentido de la presente invención, y por lo tanto puede entenderse como un anticuerpo progenitor. Tales anticuerpos pueden servir como plantilla para una o más mutaciones de acuerdo con la presente invención, proporcionando así los anticuerpos variantes de la invención. Un ejemplo de anticuerpo progenitor que comprende otras mutaciones distintas de las de la presente invención es el anticuerpo biespecífico descrito en WO2011/131746 (Genmab), que utiliza condiciones reductoras para promover el intercambio de media molécula de dos anticuerpos que comprenden regiones CH3 similares a IgG4, formando así anticuerpos biespecíficos sin formación concomitante de agregados. Otros ejemplos de anticuerpos progenitores incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos biespecíficos, tal como los biespecíficos heterodiméricos: Triomabs (Fresenius); IgG1 e IgG2 biespecíficos (Rinat neurosciences Corporation); Fc Δ Adp (Regeneron); Botones en ojaes (Genentech); dirección electrostática (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbodies (Merck); Andamio azimétrico (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); y LUZ-Y (Genentech). Otros formatos de ejemplo de anticuerpos progenitores incluyen, sin limitación, un anticuerpo de tipo silvestre, un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo que contenga Fc, un anticuerpo humano o cualquier combinación de los mismos.

El anticuerpo progenitor puede unirse a cualquier diana, ejemplos de tales dianas o antígenos contra los que la invención puede dirigirse, y no se limita a ello, son; 5T4; ADAM-10; ADAM-12; AFP; AXL; ANGPT2 antígeno de ántrax; BSG; CAIX; CXII; CA 72-4; antígeno asociado a carcinoma CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; Claudin4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; Cripto; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; Receptor de endotelina B; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP alfa; Fc gamma RI; FCER2; FGFR3; cadena beta de la fibrina II; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; gangliósido GD3; GDF2; GLP1R; Glypican-3; GPNMB; HBV (virus de la hepatitis B); HCMV (citomegalovirus humano); homólogo de la proteína de choque térmico 90 [*Candida albicans*]; glicoproteína gD del virus del herpes

simple; HGF; VIH-1; VIH-1 IIB gp120 bucle V3; HLA-DRB (HLA-DR beta); virus respiratorio sincitial humano, glicoproteína F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 biespecífico; IgE Fc; IGF1R; región de conexión IGHE; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; subunidad beta del receptor de interleucina 2; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; Lewis-y; lípido A, dominio del lipopolisacárido LPS; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; antígeno de células granulocíticas NCA-90; Nectina 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; fosfatidilserina; PTK-7; *Pseudomonas aeruginosa* serotipo IATS O11; RSV (virus respiratorio sincitial humano, glicoproteína F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; subunidad B de la toxina tipo Shiga II [*Escherichia coli*]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; ácido lipoteico de *Staphylococcus epidermidis*; receptor de células T alfa_beta; TF; TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; y Vimentina.

El anticuerpo progenitor puede ser cualquier anticuerpo humano de cualquier isotipo, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM e IgD, opcionalmente un anticuerpo humano de longitud completa, como un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa. El anticuerpo progenitor puede comprender una secuencia según cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 5.

Los anticuerpos monoclonales, tales como los progenitores y/o variantes, para uso en la presente invención, pueden producirse, por ejemplo, por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos como ratas, perros, primates, etc.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra cualquier antígeno pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcrómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Tales ratones transgénicos y transcrómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb® y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos".

El ratón HuMAb® contiene un minigén de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y ligera (κ) no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos, sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb® se describe detalladamente en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véase también US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una disrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una disrupción CMD en sus genes de cadena pesada endógena (tal como se describe en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), y un transgén de cadena ligera κ humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Además, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en US 5,770,429), los ratones HCo12 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 de WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 de WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan transgenes de cadenas pesadas de inmunoglobulina humana y de cadenas ligeras κ en un fondo homocigótico para la disrupción de los loci de cadenas pesadas y ligeras κ endógenas de ratón.

En la cepa de ratón KM, el gen de la cadena ligera κ endógena de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen de la cadena pesada endógena de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera κ humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcrósoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF (SC20) del cromosoma 14, como se describe en WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/C pueden generarse cruzando HCo12 con KCo5[J/K](Balb) como se describe en WO/2009/097006. Los esplenocitos de estos

ratones transgénicos pueden utilizarse para generar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas.

Además, cualquier región de unión a antígeno puede obtenerse a partir de anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies identificados mediante tecnologías de visualización, incluyendo, sin limitación, visualización de fagos, visualización retroviral, visualización ribosomal y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales técnicas son bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (visualización de fagos), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (visualización de fagos), Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (visualización de ribosomas), Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (visualización de fagos), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), y US 5,733,743). Si se utilizan tecnologías de visualización para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

Una mutación de acuerdo con la presente invención puede ser, pero no se limita a, una delección, inserción o sustitución de uno o más aminoácidos. Dicha sustitución de aminoácidos puede ser con cualquier aminoácido natural o no natural.

"Mutantes simples"

Debe entenderse que todas las realizaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

Las variantes de anticuerpo o de polipéptido según el aspecto de "mutante simple" de la presente invención comprenden una mutación, típicamente una sustitución de aminoácido, en uno o más residuos de aminoácidos mostrados en la Tabla 1, que enumera cada residuo de aminoácido, numerado según el índice EU en un anticuerpo IgG1 humano, junto con el aminoácido en la posición correspondiente en un anticuerpo progenitor IgG2, IgG3, e IgG4 y sustituciones de aminoácido "De ejemplo" y "Preferidas". En la Figura 2 se muestra el segmento IgG2 correspondiente a los residuos 126 a 326, el segmento IgG3 correspondiente a los residuos 177 a 377 y el segmento IgG4 correspondiente a los residuos 127 a 327 en IgG1.

Tabla 1: Lugares de mutación y sustituciones de aminoácidos de ejemplo para el aspecto de "mutante simple"

Aminoácido (IgG1)	Aminoácido (IgG2)	Aminoácido (IgG3)	Aminoácido (IgG4)	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
P247	P247	P247	P247	ACDFGHIKLMNRSTVW	G
1253	1253	1253	1253	ADKLMNRSV, alternativamente EQT	LV, alternativamente QN
S254	S254	S254	S254	EFGHIKLPTVW	L
H310	H310	H310	H310	AGFKLPRTVW, alternativamente NQY	PW, alternativamente Q
Q311	Q311	Q311	Q311	ACEGHFIKLNPRSTWY	LW, alternativamente ER
E345	E345	E345	E345	ACDGHFIKLMNPQRSTVWY	ADGHFIKLMNPQRS TVWY
D356/E356	E356	E356	E356	GILRTV	R
T359	T359	T359	T359	GNPR	R
E382	E382	E382	E382	FKLMPVW, alternativamente DHNQSTY	LV, alternativamente DQKR
G385	G385	G385	G385	ADHILNPQRSTV, alternativamente EKWY	NR, alternativamente DEKR
Q386	Q386	Q386	Q386	ACDEGHFIKLNPRSTVWY	K
E430	E430	E430	E430	ACDFGHIKLMNPQRSTVWY	ADGHFIKLMNPQRS TVWY
H433	H433	H433	H433	R	R
N434	N434	N434	N434	DEGKRSVW, alternativamente HQT Y	W, alternativamente QHKR

Aminoácido (IgG1)	Aminoácido (IgG2)	Aminoácido (IgG3)	Aminoácido (IgG4)	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Y436	Y436	F436	Y436	IKLRSTVW, alternativamente AEFHMQ	IV, alternativamente NQST
Q438	Q438	Q438	Q438	CEIKLSTVWY, alternativamente AGHNQR	CL, alternativamente NST
K439	K439	K439	K439	ADEHLPRTY, alternativamente QW	DEHR, alternativamente Q
S440	S440	S440	S440	ACDEGHFIKLMNPQRTVWY	WY, alternativamente DEQ
K447	K447	K447	K447	DENQ, delección	DENQ, delección

Como se ve en la Tabla 1, las sustituciones de aminoácidos que resultaron en un aumento de la lisis celular de células Wien133 en el Ejemplo 19 se incluyen como "Sustituciones preferidas".

- 5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la unión de la variante al receptor Fc neonatal (FcRn) puede determinarse mediante el método descrito en el Ejemplo 34.
- 10 En otra divulgación, una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que aumente o disminuya la unión de la variante al receptor Fc neonatal (FcRn) en más del 30%, tal como de más del 20%, 10% o 5% medido por un cambio en la absorbancia OD405 nm según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 34.
- 15 En otra divulgación, una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que aumente la afinidad aparente del anticuerpo progenitor por el receptor Fc neonatal de ratón (FcRn) en más de un factor 0.5 o que no disminuya la afinidad aparente del polipéptido progenitor o del anticuerpo progenitor por el FcRn de ratón en más de un factor 2, según se determina por el método descrito en el Ejemplo 34.
- 20 En una divulgación, las mutaciones se seleccionan del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.
- 25 En una divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc que alteren la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de la variante.
- En una divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la tasa de depuración plasmática de la variante según se determina en los métodos divulgados en el Ejemplo 37.
- 30 En otra divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc que aumente o disminuya la tasa de depuración plasmática de la variante en más de un factor 3.0, tal como en más de un factor 2.5, factor 2.0, factor 1.5 o factor 1.2 según se determine por los métodos divulgados en el Ejemplo 37.
- En una divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la semivida sérica de la variante.
- 35 En una divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la activación del complemento en fase fluida independiente de la diana de la variante según se determina por el método divulgado en el Ejemplo 36.
- En una divulgación, la variante no contiene ninguna otra mutación en el dominio Fc.
- En una divulgación, la variante comprende sólo una mutación.
- 40 En una divulgación, el polipéptido variante puede ser un anticuerpo variante que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En una divulgación específica, la sustitución de aminoácidos es E345R.

Como se muestra en los Ejemplos, las variantes del anticuerpo CD38 HuMab-005 y -003 (como se describe en WO 2006/099875) y/o el anticuerpo CD20 HuMab-7D8 y -11B8 (como se describe en WO 2004/035607) y el anticuerpo rituximab y/o EGFR HuMab-2F8 (como se describe en WO 2002/100348) que comprenden una de estas sustituciones de aminoácidos tenían mayor unión a C1q, activación del complemento y/o CDC que los HuMab 005 y 7D8 de tipo silvestre, respectivamente.

Debe entenderse que la variante también puede comprender una de las mutaciones de las "Sustituciones de ejemplo" enumeradas en la Tabla 1. La variante también puede comprender más de una mutación, tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis de cualquiera de las mutaciones enumeradas en la Tabla 1.

Además de las mutaciones indicadas, la variante puede tener cualquiera de las características descritas para el anticuerpo progenitor. En particular, puede ser un anticuerpo humano. Además de las mutaciones, la variante puede ser de cualquier subtipo IgG.

Cuando está unido a su antígeno en la superficie de una célula que expresa el antígeno, en una membrana celular, en un virión o en otra partícula, o el antígeno está asociado con un virión, opcionalmente en el que el antígeno está comprendido en la cubierta proteica o una envoltura lipídica del virión, dicha variante de anticuerpo puede tener, en comparación con el anticuerpo progenitor, al menos uno de los siguientes aumentos: (i) CDC mediada por el anticuerpo, (ii) activación del complemento mediada por el anticuerpo, (iii) unión a C1q, (iv) formación de oligómeros, (v) estabilidad de oligómeros, o una combinación de cualquiera de (i) a (v). En una realización de (iv) o (v), el oligómero es un hexámero. En una divulgación, la variante también ha aumentado la ADCC en comparación con el polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor. En otra realización, la variante conserva una tasa de depuración plasmática igual o similar en comparación con el polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor. En una realización adicional, la variante no tiene una tasa de depuración plasmática que aumente o disminuya en más de un factor de 3.0, tal como más de un factor 2.5, factor 2.0, factor 1.5 o factor 1.2 según se determine en el método según se describe en el Ejemplo 37 en comparación con el polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor.

Sin estar limitado a ninguna teoría específica, el efecto causado por la sustitución de aminoácidos en las posiciones indicadas, con los residuos de aminoácidos de la presente invención puede, por ejemplo, causar el efecto en sí mismo, estar implicado en el contacto con el dominio Fc de otra molécula directamente, o puede mutarse para interactuar con otro dominio Fc directamente o afectar indirectamente a la interacción intermolecular Fc:Fc. Así, se cree que las sustituciones, sin estar limitadas por la teoría, mejoran directa o indirectamente la fuerza de unión entre las moléculas de anticuerpo en la forma oligomérica, aumentando la estabilidad de la estructura oligomérica, como una estructura hexamérica, pentamérica, tetramérica, trimérica o dimérica. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede ser una que promueva o refuerce la formación de nuevos enlaces intermoleculares Fc:Fc, tales como, pero no limitados a, interacciones Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones carga-carga, o interacciones de apilamiento aromático, o una que promueva el aumento de entropía en la interacción Fc:Fc por liberación de moléculas de agua. Además, con referencia a la Tabla 1, las "Sustituciones de ejemplo" pueden seleccionarse basándose en el tamaño y las propiedades fisicoquímicas que participan o promueven interacciones intermoleculares Fc:Fc o interacciones intramoleculares. Las "Sustituciones preferidas" pueden seleccionarse basándose en el tamaño y las propiedades fisicoquímicas óptimas para participar o estimular las interacciones intermoleculares Fc:Fc o las interacciones intramoleculares.

En una divulgación, la variante puede comprender mutaciones adicionales seleccionadas de la Tabla 1.

En una divulgación, la variante comprende una combinación de dos mutaciones en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E345X/E430X, E345X/S440Y, E345X/S440W, E430X/S440Y, y E430X/S440W.

En cualquier divulgación en la que tal mutación en al menos dos aminoácidos esté comprendida en la variante, puede estar presente en cada una de las cadenas pesadas de la variante, o una de las dos puede estar comprendida en una de las cadenas pesadas y la otra puede estar comprendida en la otra cadena pesada, respectivamente, o viceversa.

En una divulgación, la mutación en dos residuos de aminoácidos es una delección, inserción o sustitución. Dicha sustitución de aminoácidos puede ser con cualquier aminoácido de origen natural o artificial.

Las mutaciones de acuerdo con la presente invención pueden ser cada una, pero no se limitan a, una delección, inserción o sustitución de uno o más aminoácidos. Dicha sustitución de aminoácidos puede ser con cualquier aminoácido de origen natural o no natural.

Así, en una divulgación, la mutación en al menos un residuo de aminoácido es una delección.

En otra divulgación, la mutación en al menos un residuo de aminoácido es una inserción.

En otra divulgación, la mutación en al menos un residuo de aminoácido es una sustitución.

Combinaciones específicas de ejemplo de una mutación en dos residuos de aminoácido son E345R/E430T, E345R/S440Y, E345R/S440W, E345R/E430G, E345Q/E430T, E345Q/S440Y, E345Q/S440W, E430T/S440Y, y E430T/S440W.

Aparte de las mutaciones en uno o más aminoácidos según las divulgaciones de la invención, la cadena pesada de IgG puede comprender mutaciones adicionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mutaciones que mejoran aún más las funciones efectoras. Tales mutaciones adicionales incluyen mutaciones conocidas que mejoran la CDC, la unión al receptor Fc-gamma o la unión a FcRn y/o mejoran las funciones efectoras mediadas por el receptor Fc-gamma.

En una divulgación, una variante de acuerdo con la invención comprende además una modificación conocida que mejora la CDC, por ejemplo, un intercambio de segmentos entre isotipos de IgG para generar moléculas de IgG quiméricas (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72); una o más sustituciones de aminoácidos en la región bisagra (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138), y/o una o más sustituciones de aminoácidos en o cerca del sitio de unión a C1q en el dominio CH2, centradas alrededor de los residuos D270, K322, P329 y P331 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564 y WO 99/51642). Por ejemplo, en una divulgación, una variante de acuerdo con la invención comprende además una combinación de cualquiera de las sustituciones de aminoácidos S267E, H268F, S324T, S239D, G236A e I332E, proporcionando una función efectora mejorada mediante CDC o ADCC (Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189)). También pueden utilizarse en las variantes de la invención otras mutaciones Fc que afectan a la unión a receptores Fc (descritas en WO 2006/105062, WO 00/42072, Patente U.S. 6.737.056 y Patente U.S. 7.083.784) o propiedades físicas de los anticuerpos (descritas en WO 2007/005612 A1).

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

En una divulgación, una variante de acuerdo con la invención se modifica adicionalmente en el sitio de unión a FcRn, por ejemplo, para ampliar la semivida (t_{1/2}) de los anticuerpos IgG. Tales modificaciones incluyen (i) mutaciones N434A y T307A/E380A/N434A (Petkova et al. Int Immunol. 2006 Dec; 18(12):1759); (ii) una sustitución de uno o más de Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382, y Asn434 en un residuo de alanina que mejora la unión a FcRn (Shields RL, et al. J. Biol. Chem. 2001; 276:6591); y (iii) una sustitución de aminoácidos o combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionada de M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, H433R/N434Y/Y436H, M252Y/S254T/T256E-H433K/N434F/Y436H or M252Y/S254T/T256EG385R/Q386T/P387R/N389P en IgG1, aumentando la afinidad por FcRn (Dall'Acqua et al., *supra*).

"Mutante doble"

Debe entenderse que todas las divulgaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

Como se ha descrito anteriormente y más adelante, la presente invención también se refiere a un aspecto de "mutante doble", en el que dos mutaciones disminuyen individualmente cada una una función efectora, pero juntas restauran la función efectora al nivel del anticuerpo progenitor. Cuando se utilizan conjuntamente, aumenta la especificidad de la variante. Las variantes de anticuerpo según el aspecto de "mutante doble" comprenden dos mutaciones, típicamente sustituciones de aminoácidos, en el par específico de interacción de residuos de aminoácidos K439 y S440, K447 y 448, o K447, 448 y 449.

Así, en un aspecto la presente invención se refiere a una variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la variante comprende una primera mutación seleccionada del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W, tal como E430G, E430S, E345K, o E345Q, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y una segunda mutación seleccionada del grupo correspondiente a

(i) un residuo de aminoácido correspondiente a K439 y S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W, y si la primera mutación es S440Y o S440W la segunda mutación sea en el residuo de aminoácido correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana,

(ii) un residuo de aminoácido correspondiente a K447D/E o correspondiente a K447K/R/H y 448P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; o

(iii) un residuo de aminoácido correspondiente a K447D/E o correspondiente a K447K/R/H y 448K/R/H y 449P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana. Las Tablas 2A y B muestran "Sustituciones de ejemplo" y "Sustituciones preferidas" para los aspectos "mutante doble" (Tabla A) y "mutante mixto" (Tabla 2B).

Tabla 2A: Sitios de mutación y sustituciones de aminoácidos de ejemplo para aspectos de "mutante doble".

Par de aminoácidos (IgG1,2,3,4)	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
K439/S440	K439ED, alternativamente ED	R/S440KR, K439E/S440K
K447/448/449	K447ED/448KRH/449P	K447E/448K/449P
K447/448	K447KRH/448ED	K447K/448E

5

Tabla 2B: Sitios de mutación y sustituciones de aminoácidos de ejemplo para el aspecto de "mutantes mixtos" (Ab1 + Ab2)

Par de aminoácidos (IgG1)	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
K439 + S440	K439DER + S440DEKR	K439E + S440K
K447 + K447/448	K447DE + K447KRH/448P	K447E + K447/448P
K447 + K447/448/449	K447DE + K447KRH/448KRH/449P	K447E + K447/448K/449P

10 En una divulgación, la variante comprende una primera mutación seleccionada del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R y E345Y, y una segunda mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 y S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y y S440W.

15 Se contempla por la presente invención que la variante también puede comprender sólo una de las sustituciones de residuos de aminoácidos, tal como K439E o S440K, tal como la variante comprende una mutación en K439, opcionalmente sin mutación en S440.

En una realización, la invención se refiere a la variante, en la que la mutación en K439 es una sustitución de aminoácido en un aminoácido seleccionado entre E y D, tal como K439E.

En otra realización, la variante comprende una mutación en S440, opcionalmente sin mutación en K439.

20 En una realización, la invención se refiere a la variante, en la que la mutación en S440 es una sustitución de aminoácido en un aminoácido seleccionado entre K y R, tal como S440K.

En una divulgación, la variante comprende mutaciones tanto en K439 como en S440.

En otra realización, la mutación en K439 se selecciona de K439 a D, E o R, tal como K439D/E, y la mutación en S440 se selecciona de S440 a D, E, K, y R, tal como S440K/R.

25 En otra realización, la mutación en K439 se selecciona entre K439D y K439E, y la mutación en S440 se selecciona entre S440K y S440R.

En otra realización, la variante comprende las mutaciones K439E y S440K.

En una realización, el polipéptido progenitor es un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

30 Como se describe en los Ejemplos 4-6, las variantes de anticuerpo que comprendían sólo una de las mutaciones K439E y S440K tenían una K_D drásticamente aumentada para C1q, reflejando una activación del complemento disminuida y/o capacidad CDC. Sorprendentemente, se descubrió que las variantes de anticuerpo de HuMAb 7D8 o 005 que comprendían ambas mutaciones tenían una unión a C1q o CDC restaurada o aumentada. Sin ceñirnos a ninguna teoría específica, el mecanismo subyacente podría explicarse quizás por la compensación estérica mutua de las respectivas mutaciones, como se ilustra en las Figuras 4 y 5.

35 En una realización, el polipéptido progenitor, y por lo tanto la variante del mismo, puede ser un anticuerpo que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En otra divulgación, la variante que comprende una mutación en ambas posiciones K439 y S440 como se describe aquí tiene un aumento en una función efectora mediada por Fc seleccionada de citotoxicidad dependiente de

complemento (CDC), unión a C1q, activación de complemento, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), unión a receptor Fc incluyendo unión a receptor Fc-gamma, unión a Proteína A, unión a proteína G, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), citotoxicidad potenciada por el complemento, opsonización, internalización de polipéptidos que contienen Fc, reducción de la diana, captación de ADC, inducción de apoptosis, muerte celular, detención del ciclo celular, y cualquier combinación de las mismas, en comparación con el anticuerpo progenitor o una variante de anticuerpo que comprenda una mutación en sólo uno de K439 y S440.

La invención también prevé el uso de las mutaciones K439E y S440K en un anticuerpo para restaurar uno o más de (i) la CDC mediada por el anticuerpo, (ii) la activación del complemento mediada por el anticuerpo, (iii) la avidez de unión a C1q, (iv) la formación de oligómeros, (v) la estabilidad de oligómeros, o una combinación de cualquiera de (i) a (v), en comparación con el anticuerpo progenitor, que puede, por ejemplo, ser un anticuerpo de tipo natural o una variante de anticuerpo que comprenda sólo una de las mutaciones K439E o S440K. En una divulgación de (iv) o (v), el oligómero es un hexámero.

En una realización, la variante se selecciona entre un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

Mutantes mixtos

Debe entenderse que todas las divulgaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

Como se ha descrito anteriormente, los inventores de la presente invención también han descubierto que hay mutaciones que por sí solas disminuyen una función efectora, pero cuando se usan juntas se restablece la función efectora, por ejemplo, las mutaciones en las posiciones K439 y S440 de en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana. Este concepto también puede utilizarse para garantizar el emparejamiento de dos anticuerpos diferentes, por ejemplo, introduciendo K439 en un anticuerpo y S440 en el otro. Así pues, las variantes de anticuerpos según el aspecto de "mutante mixto" comprenden una mutación, pero una que conduce típicamente a una interacción Fc:Fc reducida o muy reducida entre moléculas Fc idénticas. Sin embargo, como las variantes de anticuerpo "mutantes mixtos" de la invención son capaces de emparejarse entre sí; proporcionando una CDC restaurada o incluso aumentada, unión a C1q, activación del complemento, formación de oligómeros, y/o estabilidad de oligómeros para el par de variantes de anticuerpo específicas, en comparación con, por ejemplo, cada variante sola o una mezcla del anticuerpo o anticuerpos progenitores. En una divulgación de la invención, el oligómero es un hexámero. En una divulgación, el par de variantes de anticuerpo también o alternativamente tiene una función efectora retenida o mejorada, tal como unión a C1q, activación del complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), unión a FcRn, unión a receptor Fc, incluyendo unión a receptor Fc-gamma, unión a Proteína A, unión a proteína G, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), citotoxicidad potenciada por el complemento, opsonización, internalización de polipéptidos que contienen Fc, submodulación de la diana, captación de ADC, inducción de apoptosis, muerte celular, detención del ciclo celular y cualquier combinación de las mismas. Este aspecto de la invención proporciona una serie de aplicaciones en las que puede regularse no sólo la fuerza sino también la selectividad en la unión a C1q, la activación del complemento, la CDC u otra función efectora.

En la Tabla 2B se muestran sitios de mutación de ejemplo para cada variante de anticuerpo en un par "mutante mixto". Específicamente, la invención proporciona una variante de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno y un dominio Fc de una inmunoglobulina, cuya variante comprende una mutación en un residuo en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana correspondiente a uno de K439 y S440.

En una divulgación, la mutación está en K439, y es una sustitución de aminoácido en un aminoácido seleccionado de E o D, tal como K439E. En una divulgación, la mutación está en S440, y es una sustitución de aminoácido en un aminoácido seleccionado de K o R, tal como S440K.

En una divulgación, la variante comprende una mutación aminoacídica sólo en la posición correspondiente a K439 y no a la posición S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1.

En una divulgación, la variante comprende una mutación aminoacídica sólo en la posición correspondiente a S440 con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W, y no comprende una mutación aminoacídica en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1.

Así, en una divulgación la presente invención también se refiere a una variante que comprende una primera mutación seleccionada del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y una segunda mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En otra divulgación la presente invención también se refiere a una variante que comprende una primera mutación seleccionada del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, y E345Y en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y una segunda mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la segunda mutación no sea S440Y o S440W.

En una divulgación, las dos divulgaciones descritas anteriormente pueden combinarse en el aspecto de par "mutante mixto" de acuerdo con la presente invención.

Cada variante en un par "mutante mixto" puede comprender además una mutación en un aminoácido enumerado en la Tabla 1.

En una divulgación de la presente invención, el par "mutante mixto" comprende una primera variante de un anticuerpo progenitor y una segunda variante de un anticuerpo progenitor, en la que la primera variante comprende un primer dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno, en la que dicha primera variante comprende (i) una primera mutación en uno o más residuos de aminoácidos distintos de una mutación en K439 seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, y S440W, tales como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y una segunda mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y

en la que la segunda variante comprende un segundo dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno, en la que dicha segunda variante comprende (i) una primera mutación en uno o más residuos de aminoácidos distintos de una mutación en S440 seleccionados del grupo correspondiente a E430X y E345X, tales como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R y E345Y, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana,

y (ii) una segunda mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W.

Otros pares "mutantes mixtos" de ejemplo pueden comprender además, y no se limita a, cualquiera de los siguientes pares; una primera variante que comprende la mutación K447E y una segunda variante que comprende la mutación K447/P448; una primera variante que comprende la mutación K447E y una segunda variante que comprende la mutación K447/K448/P449.

En una divulgación, la mutación es una delección, inserción o sustitución. Dicha sustitución de aminoácidos puede ser con cualquier aminoácido de origen natural o no natural.

En una divulgación, la mutación es una delección.

En otra divulgación, la mutación es una inserción.

En otra divulgación, la mutación es una sustitución de un aminoácido.

En una divulgación particular, la primera variante y/o segunda variante comprende una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

Por ejemplo, en una divulgación, una variante en un par "mutante mixto" comprende una de E430G, E430S, E345K o E345Q junto con mutaciones K439E, mientras que la otra variante comprende una de E430G, E430S, E345K o E345Q junto con mutaciones S440K, proporcionando así una avidéz de unión a C1q aumentada y más específica, activación del complemento, formación de oligómeros CDC, formación de oligómeros, estabilidad de oligómeros y/u otras funciones relacionadas con efectores tales como ADCC, unión a receptor Fc-gamma, unión a Proteína A, unión a proteína G, ADCP, CDCC, citotoxicidad potenciada por complemento, fagocitosis mediada por anticuerpo, internalización, apoptosis, unión a receptor de complemento de un anticuerpo opsonizado y/o combinaciones de las mismas.

El aspecto de "mutante mixto" también puede comprender dos variantes que comprenden cada una más de una mutación enumerada en la Tabla 2A, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, como una primera variante que comprende las mutaciones S440K/K447E, y una segunda variante que comprende la mutación K439E/K447/P448; como una primera variante que comprende las mutaciones K439E/K447E, y una segunda variante que comprende la mutación S440K/K447/P448.

Las variantes en un par "mutante mixto" como se describe aquí pueden derivar del mismo o de diferentes anticuerpos progenitores. Además, el aspecto de "mutante mixto" también puede emplearse en anticuerpos biespecíficos o asimétricos. Además, el primer, segundo y tercer anticuerpo pueden unirse a diferentes epítomos, en la misma diana o en dianas diferentes.

Además, el aspecto de "mutante mixto" puede proporcionar una respuesta CDC u otro efector que se dirige más específicamente a células tumorales que expresan dos antígenos tumorales específicos, utilizando un primer

- anticuerpo contra el primer antígeno con una mutación K439E y un segundo anticuerpo contra el segundo antígeno con una mutación S440K o S440R. Utilizando el aspecto de "mutante mixto" que comprende tres variantes, siendo opcionalmente anticuerpos biespecíficos, puede proporcionar una respuesta CDC u otro efector que se dirige más específicamente a las células tumorales que expresan al menos dos, tales como dos, tres, cuatro, cinco o seis, antígenos tumorales específicos.
- En una divulgación de cualquiera de los aspectos "mutante simple", "mutante doble" y "mutante mixto", la variante se selecciona de entre un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.
- En cualquier divulgación del aspecto de "mutante mixto", la primera, segunda y/o tercera variante puede comprender la misma o diferente mutación de cualquiera de las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1.
- 10 Anticuerpos multiespecíficos
- Debe entenderse que todas las divulgaciones aquí descritas con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.
- 15 Debe entenderse que cualquier divulgación de los aspectos "mutante simple", "mutante doble" y "mutante mixto" descritos en el presente documento puede utilizarse en el aspecto de anticuerpo multiespecífico descrito a continuación.
- Así, en una divulgación, la variante es un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.
- 20 En una divulgación particular, el anticuerpo biespecífico tiene el formato descrito en WO 2011/131746.
- En un aspecto principal, la invención se refiere a una variante de un anticuerpo progenitor que es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una primera región de unión a antígeno, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una segunda región de unión a antígeno, en el que la primera y la segunda regiones de unión a antígeno se unen a diferentes epítomos del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y en el que la primera y/o la segunda región CH2-CH3 comprenden una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en el que
- 25 el primer polipéptido comprende una mutación adicional en un residuo de aminoácido seleccionado entre los correspondientes a K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y
- el segundo polipéptido comprende una mutación adicional en un residuo de aminoácido seleccionado entre los correspondientes a F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en el que la mutación adicional en el primer polipéptido es diferente de la mutación adicional en el segundo polipéptido.
- 30 En una divulgación, la mutación es una delección, inserción o sustitución. Dicha sustitución de aminoácidos puede ser con cualquier ácido natural o no natural.
- El anticuerpo biespecífico de la presente invención no está limitado a un formato particular y puede ser cualquiera de los descritos anteriormente y en el presente documento.
- 40 En una divulgación particular de la presente invención, (i) el primer polipéptido comprende una mutación adicional en el residuo de aminoácido correspondiente a K409, tal como K409R, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y
- (ii) el segundo polipéptido comprende una mutación adicional en el residuo de aminoácido correspondiente a F405, tal como F405L, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; o bien, alternativamente
- 45 (iii) el primer polipéptido comprende una mutación adicional en el residuo de aminoácido correspondiente a F405, tal como F405L, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y (iv) el segundo polipéptido comprende una mutación adicional en el residuo de aminoácido correspondiente a K409, tal como K409R, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.
- En una divulgación particular, la mutación en uno o más residuos de aminoácidos se selecciona del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.
- 50

Tales anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención pueden generarse como se describe en el Ejemplo 22. Además, el efecto sobre la muerte de CDC por las proteínas heterodiméricas generadas puede probarse usando un ensayo como el usado en el Ejemplo 23.

5 El anticuerpo biespecífico puede, por ejemplo, comprender una región de unión a antígeno de un anticuerpo CD20 y una región de unión a antígeno de un anticuerpo CD38, y una sustitución de aminoácidos en uno o más aminoácidos enumerados en las Tablas 1 y/o 2A/B. Las regiones de unión a CD20 de ejemplo incluyen las de ofatumumab (2F2), 7D8 y 11B8, descritas en WO2004/035607, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad, y rituximab (WO 2005/103081). Las regiones de unión a CD38 de ejemplo incluyen las de 003 y daratumumab (005), descritas en WO2006/099875, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

10 En una divulgación, el anticuerpo biespecífico se une a diferentes epítomos en la misma diana o en dianas diferentes.

En otra divulgación, la primera mutación en el primer y segundo polipéptido puede ser la misma o diferente.

En una divulgación del aspecto de "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto" y anticuerpo multiespecífico, la variante es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM o IgE humano, opcionalmente un anticuerpo humano de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.

15 En cualquier aspecto de "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto", y en los aspectos de anticuerpos multiespecíficos, la unión a C1q del anticuerpo se determina según el ensayo descrito en el Ejemplo 4, la CDC se determina según el ensayo descrito en el Ejemplo 5, 6 o 10 la mutación no está en un residuo de aminoácido directamente implicado en la unión a C1q, opcionalmente según se determina comparando la unión a C1q en un ensayo ELISA según el Ejemplo 3 con la unión a C1q en un ensayo basado en células según el Ejemplo 4, y la ADCC se determina según el ensayo descrito en el Ejemplo 12.

20 Además, la invención proporciona una preparación de una variante de cualquier aspecto de "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto" y anticuerpo multiespecífico o divulgación descrito anteriormente. La invención también proporciona una composición que comprende una variante de cualquier aspecto y divulgación "mutante doble" descritos anteriormente, por ejemplo, una composición farmacéutica. La invención también proporciona el uso de cualquier variante, preparación o composición de este tipo como medicamento.

25 Los aspectos anteriores de "mutantes simples", "mutantes dobles", "mutantes mixtos" y anticuerpos multiespecíficos de la invención son particularmente aplicables a moléculas de anticuerpos humanos que tienen una cadena pesada IgG1 que comprende el segmento pertinente, P247 a K447, correspondiente a los residuos subrayados 130 a 330 de la región constante de la cadena pesada IgG1 humana (No. de acceso UniProt P01857; SEQ ID NO:1):

```
1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wmsgaltsgv
51 htfpavqlss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsrdet ltknqvsltc
251 lvkgfyfpsi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk
```

La presente invención también puede aplicarse a moléculas de anticuerpo que tienen una porción de cadena pesada IgG2 humana. Los residuos de aminoácidos P247 a K447 de la cadena pesada IgG1 corresponden a los residuos subrayados 126 a 326 de la región constante de la cadena pesada IgG2 (No. de acceso P01859; SEQ ID NO:2)

```
1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wmsgaltsgv
51 htfpavqlss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktkver
101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vsvlvtvvhq dwlngkeykc
201 kvsnkglpap iektisktkg qprepvytl ppsreemtkn qvsltcclvkg
251 fyfpsiavew esngqpenny kttppmlsdg gsfflysklt vdksrwqggn
301 vfscsvmhea lhnhytqksl slspgk
```

35 La presente invención también puede aplicarse a moléculas de anticuerpo que tengan una porción de cadena pesada IgG3 humana. Los residuos de aminoácidos P247 a K447 de la cadena pesada IgG1 corresponden a los residuos 177 a 377 de la región constante de la cadena pesada IgG3 (UniProt No. de acceso P01860, SEQ ID NO:3), subrayados en lo que sigue:

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktplgdttht cprcepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcepksc
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
 201 pevgfkwyvd gvevhnatk preeqynstf rvvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkalpa piektisktk ggprepqvyt lppsreemtk nqvsltclvk
 301 gfypsdiave wessggpenn ynttppmlds dgsfflyskl tvdksrwggg
 351 nifscsvmhe alhnrtqks lsispkg

- 5 La presente invención también puede aplicarse a moléculas de anticuerpo que tengan una porción de cadena pesada IgG4 humana. Los residuos de aminoácidos P247 a K447 de la cadena pesada IgG1 corresponden a los residuos subrayados 127 a 327 de la región constante de la cadena pesada IgG4 (No. de acceso P01859, SEQ ID NO:4).

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdhkps ntkvdkrves
 101 kygppcpscp apeflggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed
 151 pevgfnwyvd gvevhnatk preeqfnsty rvvsvltvlh qdwlngkeyk
 201 ckvsnkglps siektiskak ggprepqvyt lppsqeemtk nqvsltclvk
 251 gfypsdiave wesnggpenn ykttppvlds dgsfflysrl tvdksrwgeg
 301 nvfscsvmhe alhnhytqks lsislglk

La presente invención también puede aplicarse a un anticuerpo que tenga una porción de cadena pesada de alotipo IgG1m(f) humano. La secuencia de aminoácidos del alotipo IgG1m(f) (la secuencia CH3 está subrayada) - SEQ ID NO:5

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep
 101 kscdkthtct pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakggprepg vytlppsree mtknqvsltc
 251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
 301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslsispkg

- 10 En la Figura 2 se muestra una alineación de los segmentos respectivos de las regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgG1m(f). Por consiguiente, cualquier mutación en un aminoácido descrito en la Tabla 1 o en la Tabla 2A y B puede introducirse en su posición equivalente en IgG2, IgG3, IgG4, y/o IgG1m(f) según se define por la alineación para obtener una variante de acuerdo con la invención.

- 15 En una divulgación, la invención proporciona una variante de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de longitud completa, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos según cualquier aspecto descrito anteriormente.

En cualquiera de los aspectos "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto" y anticuerpo multiespecífico, la región Fc de una cadena pesada IgG1 puede comprender la secuencia de residuos 130 a 330 de SEQ ID NO:1, residuos 126 a 326 de SEQ ID NO:2, residuos 177 a 377 de SEQ ID NO:3, o residuos 127 a 327 de SEQ ID NO:4.

- 20 En una divulgación, un anticuerpo progenitor comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID No.: 1-5, tal como SEQ ID No.:1, SEQ ID No.:2, SEQ ID No.:3, SEQ ID No.:4, o SEQ ID No.:5.

En una realización, la región Fc de una cadena pesada de IgG1 comprende la secuencia de residuos 130 a 330 de la SEQ ID NO:1.

- 25 El anticuerpo progenitor puede ser cualquier anticuerpo progenitor descrito en el presente documento. En este contexto, se entiende que el anticuerpo progenitor es también el primer anticuerpo progenitor y el segundo anticuerpo progenitor.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM o IgE.

En una realización, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo humano de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa.

5 En una realización, el anticuerpo progenitor, el primer anticuerpo progenitor y el segundo anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG1 humano, por ejemplo el alotipo IgG1m(za) o IgG1m(f), que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:1 o 5.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG2 humano, que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:2.

En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG3 humano, que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:3.

10 En una divulgación, el anticuerpo progenitor es un anticuerpo IgG4 humano, que comprende opcionalmente una región Fc que comprende SEQ ID NO:4.

15 En divulgaciones particulares de cualquiera de los aspectos "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto" y anticuerpo multiespecífico, la variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con los aminoácidos P247 a K447 de SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, y 5 de al menos 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o de al menos aproximadamente 99%, excepto las mutaciones introducidas de acuerdo con la presente invención.

Así, la variante puede comprender una secuencia según SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3, SEQ ID No: 4, o SEQ ID No:5 excepto por cualquier mutación definida aquí.

20 En cualquiera de los anteriores aspectos "mutante simple", "mutante doble", "mutante mixto" y multiespecífico de acuerdo con la presente invención puede entenderse que se incluyen las siguientes realizaciones.

25 En una realización, el primer y/o segundo anticuerpo progenitor es un fragmento de anticuerpo, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monovalente, un anticuerpo de cadena pesada, un dominio de ingeniería de intercambio de cadena (SEED), un triomab, una inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig), un anticuerpo de botón en ojal, un mini-anticuerpo, una molécula de redireccionamiento de afinidad dual (Fc-DART o Ig-DART); un anticuerpo LUZ-Y, un anticuerpo Biclonic, un anticuerpo Ig de Doble direccionamiento (DT), un anticuerpo Dos-en-Uno, un Mab reticulado, un mAb², un CovX-body, un anticuerpo biespecífico de tipo IgG, un Ts2Ab, un BsAb, un anticuerpo HERCULES, un TvAb, un anticuerpo de fusión ScFv/Fc, un SCORPION, un fragmento scFv fusionado a un dominio Fc y un fragmento scFv dual fusionado a un dominio Fc.

30 En otra realización, tanto el primer como el segundo anticuerpo progenitor se unen a un antígeno expresado en la superficie de una célula tumoral humana.

En otra realización, los antígenos para el primer y segundo anticuerpo progenitores se seleccionan por separado del grupo que consiste en erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína envoltante de HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3.

35 En otra realización, el primer y segundo anticuerpos progenitores son totalmente humanos.

En otra realización, los antígenos para el primer y segundo anticuerpo progenitores son, en cualquier orden, seleccionados entre CD20 y CD38, opcionalmente en el que el primer y segundo anticuerpos progenitores son, en cualquier orden, seleccionados entre 7D8 y 005.

40 En otra realización, tanto el primer anticuerpo como el segundo se unen a antígenos expresados en la superficie de una célula bacteriana o un virión.

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

En otra realización, el primer y segundo anticuerpo progenitores se unen al mismo antígeno.

45 En otra realización, el primer y segundo anticuerpos progenitores son el mismo anticuerpo.

En otra realización, el anticuerpo progenitor se selecciona entre 7D8 y 005.

Composiciones

Debe entenderse que todas las divulgaciones aquí descritas con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos

progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

La invención también se relaciona con composiciones que comprenden variantes y anticuerpos progenitores pueden ser cualquier variante y anticuerpo progenitor como se describe en el presente documento. A continuación se describirán aspectos y divulgaciones específicos. Además, dichas variantes pueden obtenerse de acuerdo con cualquier método descrito en el presente documento.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una primera y una segunda variante de un polipéptido progenitor que comprende cada una un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en la que la primera y/o segunda variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, la primera y/o segunda variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación preferida, la primera y/o segunda variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430G, E430S, E345K, y E345Q en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, tanto la primera como la segunda variante comprenden una o más mutaciones que pueden ser iguales o diferentes.

En otra divulgación, la primera variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W, tales como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en la que

la segunda variante no comprende una o más mutaciones en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W, como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, la composición comprende al menos una molécula que comprende al menos un dominio CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una variante de acuerdo con la invención, en la que la molécula comprende una mutación en uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, y S440W, tal como E430G, E430S, E345K, y E345Q, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

La molécula descrita en la divulgación puede denominarse "molécula de sólo Fc", y puede comprender además, por ejemplo, una región bisagra. Sin embargo, dicha región bisagra puede no estar incluida.

Una composición que comprende la molécula de sólo Fc y cualquier variante de acuerdo con la invención puede aplicarse para su uso en métodos de diagnóstico por imagen, o para modular la avidéz de las variantes una vez unidas a la superficie celular.

La molécula de sólo Fc puede comprender además una mutación adicional en un residuo de aminoácido correspondiente a K439 y/o S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación que esté en S440 no sea S440Y o S440W, y si la primera mutación es S440Y o S440W la mutación adicional esté en el residuo de aminoácido correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En otra divulgación, (i) la primera variante comprende además una mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y (ii) la segunda variante comprende además una mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación no sea S440Y o S440W; o

donde i) y ii) pueden ser alternativamente

(iii) la primera variante comprende además una mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación no sea S440Y o S440W; y

(iv) la segunda variante comprende además una mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, la mutación en la posición K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es K439D/E, y/o la mutación en la posición S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana es S440K/R.

En otra divulgación, la presente invención se refiere a la composición definida en el presente documento, en la que

(i) la primera variante comprende además un profármaco, y

(ii) la segunda variante comprende un activador para el profármaco de la primera variante; o en los que (i) y (ii) pueden ser alternativamente

(iii) la segunda variante comprende un profármaco, y

(iv) la primera variante comprende un activador para el profármaco de la segunda variante.

5 El término "profármaco" debe entenderse, de acuerdo con la presente invención, como un precursor de fármaco relativamente no citotóxico que debe someterse a conversión química, por ejemplo mediante procesos metabólicos, antes de convertirse en un agente farmacológico activo (anticanceroso). Los ejemplos de profármacos y los métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es una combinación de anticuerpos que comprende un pro-fármaco enzimático en el que la liberación del fármaco se produce mediante la unión de un anticuerpo conjugado con un pro-fármaco y la unión de un anticuerpo conjugado con un activador de dicho pro-fármaco a sus dianas antigénicas presentes en la misma célula. De este modo, el profármaco y su activador se aproximan y el fármaco se libera localmente, pudiendo, por ejemplo, penetrar en las células circundantes y matar las células. (Senter and Springer, 2001 Adv Drug Deliv Rev. 2001 Dec 31;53(3):247-64, Senter, 1994 FASEB J. 1990 Feb 1;4(2):188-93).

15 El término "activador de un profármaco" debe entenderse, de acuerdo con la presente invención, como una molécula capaz de convertir un profármaco en un fármaco activo. Los ejemplos de activadores de un profármaco y los métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de activador pueden ser las enzimas que se comportan como un catalizador para la conversión del profármaco en un fármaco activo. (Senter and Springer, 2001 Adv Drug Deliv Rev. 2001 Dec 31;53(3):247-64, Senter, 1994 FASEB J. 1990 Feb 1;4(2):188-93).

20 En una divulgación, el primer y/o segundo polipéptido progenitor es un primer y segundo anticuerpo progenitores que comprende cada uno un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.

En una divulgación, el primer y el segundo anticuerpo son cada uno un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM, o IgE, opcionalmente cada uno un anticuerpo humano de longitud completa, tal como cada uno un anticuerpo humano IgG1 de longitud completa.

25 En una divulgación, el primer y el segundo anticuerpo se seleccionan cada uno de un anticuerpo monoespecífico, biespecífico o multispecífico.

En otra divulgación, el primer y/o segundo anticuerpo progenitor es cada uno un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido que comprende una primera región CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una primera región de unión a antígeno, y un segundo polipéptido que comprende una segunda región CH2-CH3 y una segunda región de unión a antígeno, en el que la primera y la segunda regiones de unión a antígeno se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y en el que dicha primera región CH2-CH3 comprende una mutación de aminoácidos adicional en una posición seleccionada entre las correspondientes a K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la segunda región CH2-CH3 comprende una mutación adicional de aminoácidos en una posición seleccionada de entre las correspondientes a F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y en la que la mutación adicional de aminoácidos en la primera región CH2-CH3 es diferente de la mutación adicional de aminoácidos en la segunda región CH2-CH3.

40 En una divulgación preferida, la mutación adicional de aminoácidos de la primera región CH2-CH3 está en la posición correspondiente a K409, tal como K409R, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y en la que la mutación adicional de aminoácidos de la segunda región CH2-CH3 está en la posición correspondiente a F405, tal como F405L, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.

En una divulgación, la primera y la segunda variante de la composición se unen a diferentes epítopos en el mismo antígeno o en antígenos diferentes.

45 En una divulgación, una o ambas de la primera y segunda variantes son conjugadas a un fármaco, toxina o radiomarcador, tal como en donde una o ambas de la primera y segunda variantes son conjugadas a una toxina a través de un enlazador.

En una divulgación, una o ambas de las variantes primera y segunda forman parte de una proteína de fusión.

En una divulgación particular, la primera y/o segunda variante de la composición comprende sólo una mutación.

50 En las divulgaciones, en las que la segunda variante no comprende ninguna de las mutaciones enumeradas aquí descritas, dicha segunda variante puede incluir cualquiera de los ejemplos adecuados de segundo anticuerpo enumerados anteriormente en relación con los métodos de aumento de CDC.

En una divulgación, la al menos una primera mutación en la primera y segunda variantes son diferentes.

En una divulgación, la primera variante y la segunda variante son cada una un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM o IgE, opcionalmente cada uno un anticuerpo humano de longitud completa, tal como cada uno un anticuerpo humano IgG1 de longitud completa.

5 En una divulgación, la primera variante y la segunda variante se seleccionan cada una entre un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

En otra divulgación, la primera y la segunda variante se unen a diferentes epítomos en el mismo antígeno o en diferentes antígenos. Así, en la divulgación, en la que el primer y el segundo anticuerpo son anticuerpos biespecíficos pueden unirse cada uno a dos epítomos diferentes. Los al menos dos anticuerpos biespecíficos pueden ser iguales o diferentes. Si los anticuerpos biespecíficos son diferentes, la composición, por lo tanto, comprende dirigir hasta cuatro epítomos diferentes en las mismas o diferentes dianas.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende cualquier variante, cualquier anticuerpo biespecífico o cualquier composición descrita en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se contempla que cualquiera de las divulgaciones según el aspecto de "mutante mixto" también puede estar comprendida en cualquiera de las divulgaciones de composición.

15 En una divulgación, las variantes de los primero y segundo anticuerpos progenitores se unen a antígenos expresados en la misma célula.

En otra divulgación, la variante del primer anticuerpo progenitor comprende una sustitución de aminoácido de K439 en un aminoácido seleccionado entre E y D.

En otra divulgación, la sustitución de aminoácidos en la variante del primer anticuerpo progenitor es K439E.

20 En otra divulgación, la variante del segundo anticuerpo progenitor comprende una sustitución de aminoácido de S440 en un aminoácido seleccionado de K, y R.

En otra divulgación, la sustitución de aminoácidos en la variante de la segunda variante de anticuerpo progenitor es S440K.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la variante del primer polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor y la variante del segundo polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor de una cualquiera de las divulgaciones enumeradas anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales como las divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir, por ejemplo, diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, agentes de isotonicidad, antioxidantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica. Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol).

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En una divulgación, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. El término "administrado parenteralmente" como se usa aquí significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

Kit de partes

45 Debe entenderse que todas las divulgaciones aquí descritas con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

La invención también se refiere a kits de partes para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia que comprenden variantes de los polipéptidos y anticuerpos progenitores, en los que cualquier variante del polipéptido y anticuerpo progenitores puede ser como se describe en el presente documento. A continuación se describirán aspectos y divulgaciones específicos. Además, dichas variantes pueden obtenerse según cualquier método descrito en el presente documento.

- En un aspecto la presente invención se relaciona con un kit de partes para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia que comprende una primera variante de un polipéptido progenitor y una segunda variante de un polipéptido progenitor, donde la primera variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, y S440W, tales como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W, en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la unión de la variante al receptor Fc neonatal (FcRn), y en la que
- 5 (i) dicha primera variante comprende una mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y dicha segunda variante comprende una mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, con la condición de que la mutación en S440 no sea S440Y o S440W,
- 10 (ii) dicha primera variante comprende una mutación en la posición correspondiente a K447D/E en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, y dicha segunda variante comprende una mutación en la posición correspondiente a K447K/R/H y 448P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, o
- 15 (iii) dicha primera variante comprende una mutación en la posición correspondiente a K447D/E en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana; y dicha segunda variante comprende una mutación en la posición correspondiente a K447K/R/H, 448K/R/H y 449P en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.
- En una divulgación, la primera o ambas de la variante de un polipéptido progenitor y la segunda variante de un polipéptido progenitor pueden ser un anticuerpo que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión a antígeno.
- 20 En una divulgación, la mutación en la posición correspondiente a K439 en la región Fc de la cadena pesada IgG1 humana es K439D/E, y/o la mutación en la posición correspondiente a S440 en la región Fc de la cadena pesada IgG1 humana es S440K/R.
- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de partes para uso terapéutico simultáneo, separado o secuencial, que comprende una primera variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión y una segunda variante de un polipéptido progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, en el que
- 25 la variante comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y, y S440W, tales como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana y siempre que la variante no contenga ninguna otra mutación en el dominio Fc que altere la unión de la variante al receptor Fc neonatal (FcRn), y en la que
- 30 la segunda variante no comprende una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo correspondiente a E430X, E345X, S440Y y S440W, como E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y y S440W en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana.
- En las divulgaciones, en las que la segunda variante no comprende ninguna de las mutaciones enumeradas aquí descritas, dicha segunda variante puede incluir cualquiera de los ejemplos adecuados de segundo anticuerpo enumerados anteriormente en relación con los métodos de funciones efectoras.
- 35 En una divulgación, la al menos una primera mutación en la primera y segunda variantes son diferentes.
- En una divulgación, la primera variante y la segunda variante son cada una un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM o IgE, opcionalmente cada uno un anticuerpo humano de longitud completa, tal como cada uno un anticuerpo humano IgG1 de longitud completa.
- 40 En una divulgación, la primera variante y la segunda variante se seleccionan cada una entre un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.
- En otra divulgación, la primera y la segunda variante se unen a epítopos diferentes en el mismo antígeno o en antígenos diferentes. Así, en la divulgación, en la que el primer y el segundo anticuerpo son anticuerpos biespecíficos pueden unirse cada uno a dos epítopos diferentes. Los al menos dos anticuerpos biespecíficos pueden ser iguales o diferentes. Si los anticuerpos biespecíficos son diferentes, el kit de partes para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia, por lo tanto, comprende dirigir hasta cuatro epítopos diferentes en las mismas o diferentes dianas.
- 45 En otra divulgación, una o ambas de la primera variante y la segunda variante se conjugan con un fármaco, toxina o radiomarcador, tal como donde una o ambas de la primera variante y la segunda variante se conjugan con una toxina a través de un enlazador.
- 50 En otra divulgación, una o ambas de la primera variante y la segunda variante forman parte de una proteína de fusión.

Se contempla que cualquiera de las divulgaciones según el aspecto de "mutante mixto" también puede estar comprendida en cualquiera de las divulgaciones del kit de partes para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia.

5 En una divulgación, las variantes del primero y segundo anticuerpos progenitores se unen a antígenos expresados en la misma célula.

En otra divulgación, la variante del primer anticuerpo progenitor comprende una sustitución del aminoácido K439 en un aminoácido seleccionado entre E y D.

En otra divulgación, la sustitución de aminoácidos en la variante del primer anticuerpo progenitor es K439E.

10 En otra divulgación, la variante del segundo anticuerpo progenitor comprende una sustitución de aminoácido de S440 en un aminoácido seleccionado de K y R.

En otra divulgación, la sustitución de aminoácidos en la variante de la segunda variante de anticuerpo progenitor es S440K.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit farmacéutico de partes para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia, que comprende la variante del primer polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor y la variante del segundo polipéptido progenitor o anticuerpo progenitor de una cualquiera de las divulgaciones enumeradas anteriormente.

20 El kit de partes farmacéuticas para uso terapéutico simultáneo, separado o secuencial puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En una divulgación, un kit de partes farmacéuticas para uso terapéutico simultáneo, separado o secuencial de la presente invención se administra por vía parenteral. El término "administrado parenteralmente", tal como se utiliza en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

25 Combinaciones

Además, la invención proporciona una preparación de una variante de cualquier aspecto de "mutante simple" o divulgación descrita anteriormente, es decir, preparaciones que comprenden múltiples copias de la variante. La invención también proporciona una composición que comprende una variante de cualquier aspecto de "mutante simple" y divulgación descritos anteriormente, por ejemplo, una composición farmacéutica. La invención también proporciona el uso de cualquier variante, preparación o composición de "mutante simple" como medicamento.

30 La invención también proporciona combinaciones de variantes, en las que una variante comprende al menos una mutación de acuerdo con la invención y una variante comprende al menos otra mutación de acuerdo con la invención, así como preparaciones y composiciones farmacéuticas de tales combinaciones de variantes y su uso como medicamento. Preferiblemente, las dos variantes se unen al mismo antígeno o a diferentes antígenos típicamente expresados en la superficie de la misma célula, membrana celular, virión y/u otra partícula.

Conjugados

40 Debe entenderse que todas las divulgaciones aquí descritas con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una variante, en la que dicha variante se conjuga con un fármaco, toxina o radiomarcador, como por ejemplo en la que la variante se conjuga con una toxina a través de un enlazador.

En una divulgación dicha variante es parte de una proteína de fusión.

45 En otro aspecto, la variante de la invención no se conjuga en el C-terminal a otra molécula, tal como una toxina o marcador. En una divulgación, la variante se conjuga a otra molécula en otro sitio, típicamente en un sitio que no interfiere con la formación de oligómeros. Por ejemplo, la variante de anticuerpo puede, en el otro sitio, estar unida a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una toxina (incluido un radioisótopo) un profármaco o un fármaco. Un compuesto de este tipo puede hacer que la muerte de las células diana sea más eficaz, por ejemplo, en la terapia del cáncer. La variante resultante es, por tanto, un inmunconjugado.

50 Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo unido o conjugado a una o más fracciones terapéuticas, como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, una citoquina, un inmunosupresor y/o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan en el presente documento "inmunconjugados" o "conjugados de fármacos". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, maytansina o un análogo o derivado de la misma, antibióticos antitumorales enedienos, incluida la neocarzinostatina, calicheamicinas, esperamicinas, dinemicinas, lidamicina, kedarcidina o análogos o derivados de las mismas, antraciclinas, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (a.k.a. raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), dolastatina, pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepinas (PDB) o análogos de las mismas, antibióticos (tales como dactinomicina (antes actinomicina) bleomicina, daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), agentes antimitóticos (por ejemplo, inhibidores de la tubulina) como la monometil auristatina E, la monometil auristatina F u otros análogos o derivados de la dolastatina 10; Inhibidores de la histona desacetilasa como los ácidos hidroxámicos tricotestatina A, vorinostat (SAHA), belinostat, LAQ824 y panobinostat, así como las benzamidas, entinostat, CI994, mocetinostat y compuestos de ácidos alifáticos como el fenilbutirato y el ácido valproico, inhibidores del proteasoma como Danoprevir, bortezomib, amatoxinas como α -amantina, toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A diftérica y sus fragmentos activos y moléculas híbridas); toxina ricina (tal como la ricina A o una toxina de cadena A de ricina deglicosilada), toxina del cólera, una toxina similar a la Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina del tétanos, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de la soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen péptidos antimicrobianos/líticos como CLIP, Magainin 2, mellitin, Cecropin y P18; ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral de filotaca, toxina difterina y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan et al., *Cell* 47, 641 (1986) y Goldenberg, *Calif. A Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo de la presente invención como se describe en otra parte del presente documento, tales como, por ejemplo, citoquinas o quimioquinas anticancerosas, también son candidatos para fracciones terapéuticas útiles para conjugación con un anticuerpo de la presente invención.

En una divulgación, los conjugados de fármacos de la presente invención comprenden un anticuerpo como se divulga aquí conjugado con auristatinas o análogos y derivados de péptidos de auristatina (US5635483; US5780588). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (US5663149) y antifúngica (Petit et al., (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42:2961-2965). La fracción del fármaco auristatina puede unirse al anticuerpo mediante un enlazador, a través del terminal N (amino) o del C (terminal) de la fracción peptídica del fármaco.

Las divulgaciones de ejemplo de auristatina incluyen las fracciones de fármaco DE y DF monometil auristatina enlazadas al N-terminal, divulgadas en Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. Volumen 45, número de resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en US 2005/0238649).

Una divulgación de ejemplo de auristatina es MMAE (monometil auristatina E). Otra divulgación de ejemplo de auristatina es MMAF (monometil auristatina F).

En una divulgación, un anticuerpo de la presente invención comprende un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácido nucleico. En una de dichas divulgaciones, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNsi) o un ácido nucleico inmunoestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN inmunoestimuladora que contiene un motivo CpG). En otra divulgación, un anticuerpo de la presente invención se conjuga con un aptámero o una ribozima.

En una divulgación, se proporcionan anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Una variante radiomarcada puede usarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, y ¹²⁵I, ¹³¹I, y ¹⁸⁶Re. Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados son conocidos en la técnica, (véase, por ejemplo Junghans et al., en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2nd Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y U.S. 4,681,581, U.S. 4,735,210, U.S. 5,101,827, U.S. 5,102,990 (US RE35,500), U.S. 5,648,471 y U.S. 5,697,902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse por el método de la cloramina-T.

En una divulgación, la variante de la presente invención se conjuga con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, la variante puede conjugarse con un enlazador quelante, por ejemplo DOTA, DTPA o tiuxetano, que permite que el anticuerpo forme un complejo con un radioisótopo. La variante puede también o

alternativamente comprender o estar conjugada con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Una variante radiomarcada puede utilizarse tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. En una divulgación, la variante de la presente invención se conjuga con un emisor alfa. Ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{227}Th .

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

- Las variantes de la presente invención también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Polímeros de ejemplo, y métodos para unirlos a péptidos, se ilustran por ejemplo en US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 y US 4,609,546. Entre los polímeros adicionales se incluyen los polioles polioxiethylados y el polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1,000 y aproximadamente 40,000, tal como entre aproximadamente 2,000 y aproximadamente 20,000).

- 15 Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar la variante de la presente invención con las moléculas conjugadas, como los descritos anteriormente, incluidos los métodos descritos por Hunter et al., Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) and Nygren, J. Histochem. y Cytochem. 30, 407 (1982). Tales variantes pueden producirse conjugando químicamente la otra fracción con el lado N-terminal o lado C-terminal de la variante o fragmento de la misma (por ejemplo, una cadena H o L de anticuerpo) (véase, por ejemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Dichos derivados variantes conjugados también pueden generarse por conjugación en residuos internos o azúcares, cuando proceda.

- Los agentes pueden acoplarse directa o indirectamente a una variante de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento mediante una fracción espaciadora o enlazadora a residuos de cisteína o lisina en el anticuerpo biespecífico. En una divulgación, una variante se conjuga con una molécula profármaco que puede activarse *in vivo* a un fármaco terapéutico a través de un espaciador o enlazador. En algunas divulgaciones, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de manera que la escisión del enlazador libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el entorno intracelular. En algunas divulgaciones, el enlazador es escindible por un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). Por ejemplo, los espaciadores o enlazadores pueden ser escindibles por enzimas asociadas a células tumorales u otras condiciones específicas del tumor, mediante las cuales se forma el fármaco activo. Ejemplos de tales tecnologías de profármacos y enlazadores se describen en WO02083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2009017394, WO2007089149 y WO201062171 de Syntarga BV, et al. También puede encontrarse una tecnología anticuerpo-fármaco adecuada y análogos de duocarmicina en la Patente U.S. No. 6,989,452 (Medarex), incorporada aquí por referencia. El enlazador puede ser también o alternativamente, por ejemplo, un enlazador peptídico que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo pero sin limitarse a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas divulgaciones, el enlazador peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir cathepsinas B y D y plasmina, todos los cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipéptidos dando lugar a la liberación de fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En una divulgación específica, el enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Val-Cit y diferentes ejemplos de enlazadores Phe-Lys). Los ejemplos de estructuras de un enlazador Val-Cit y un enlazador Phe-Lys incluyen pero no se limitan a MC-vc-PAB descrito a continuación, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB o MC-Phe-Lys-GABA, donde MC es una abreviatura de maleimido caproilo, vc es una abreviatura de Val-Cit, PAB es una abreviatura de p-aminobencilcarbamat y GABA es una abreviatura de ácido γ -aminobutírico. Una ventaja de utilizar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y las estabildades séricas de los conjugados son típicamente altas.

- En aún otra divulgación, la unidad de enlace no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo (véase US 2005/0238649). Típicamente, dicho enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Tal como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular" en el contexto de un enlazador significa que no más del 20%, típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de aproximadamente 10%, e inclusive aún más típicamente no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los enlazadores, en una muestra de compuesto conjugado anticuerpo-fármaco variante, se escinden cuando el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco variante se presenta en un entorno extracelular (por ejemplo, plasma). Si un enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular puede determinarse, por ejemplo, incubando el compuesto de fármaco conjugado de anticuerpo variante con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y cuantificando a continuación la cantidad de fármaco libre presente en el plasma. Las divulgaciones de ejemplo que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras (en las que Ab significa anticuerpo y p, que representa la carga de fármaco (o número promedio de fármacos citostáticos o citotóxicos por molécula de

anticuerpo), es de 1 a aproximadamente 8, por ejemplo, p puede ser de 4-6, tal como de 3-5, o p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8).

Ejemplos donde un enlazador escindible es combinado con una auristatina incluyen MC-vc-PAB-MMAF (también designado como vcMMAF) y MC-vc-PAB-MMAF (también designado como vcMMAE), donde MC es una abreviatura para maleimido caproilo, vc es una abreviatura para el enlazador basado en Val-Cit (valina-citrulina), y PAB es una abreviatura para p-aminobenzilcarbamat.

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

En una divulgación, la fracción del enlazador del fármaco es vcMMAE. La fracción del enlazador del fármaco vcMMAE y los métodos de conjugación se divulgan en WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 y US 11/833,028 (Seattle Genetics, Inc.), (que se incorporan al presente documento por referencia), y la fracción del enlazador del fármaco vcMMAE se une a los anticuerpos en las cisteínas mediante un método similar a los divulgados en los mismos.

En una divulgación, la fracción del enlazador del fármaco es mcMMAF. La fracción del enlazador del fármaco mcMMAF y los métodos de conjugación se describen en US7498298, US 11/833,954, y WO2005081711 (Seattle Genetics, Inc.), (que se incorporan aquí por referencia), y la fracción del enlazador del fármaco mcMMAF se une a las variantes en las cisteínas usando un método similar a los descritos en los mismos.

En una divulgación, la variante de la presente invención se une a un enlazador quelante, por ejemplo tiuxetan, que permite que el anticuerpo biespecífico se conjuga con un radioisótopo.

En una divulgación, cada brazo (o brazo Fab) de la variante se acopla directa o indirectamente a la misma una o más fracciones terapéuticas.

En una divulgación, sólo un brazo de la variante se acopla directa o indirectamente a una o más fracciones terapéuticas.

En una divulgación, cada brazo de la variante se acopla directa o indirectamente a diferentes fracciones terapéuticas. Por ejemplo, en las divulgaciones en las que la variante es un anticuerpo biespecífico y se prepara mediante el intercambio controlado del brazo Fab de dos anticuerpos monoespecíficos diferentes, por ejemplo, un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, como se describe en el presente documento, dichos anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse mediante el uso de anticuerpos monoespecíficos que se conjugan o asocian con diferentes fracciones terapéuticas.

Usos adicionales

Debe entenderse que todas las divulgaciones aquí descritas con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una variante de la invención como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento, en particular para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos, en los que se desea la muerte mediada por CDC de una célula diana (por ejemplo, un tumor, célula bacteriana o fúngica) u organismo diana (por ejemplo, un virus) o una célula bacteriana o infectada por virus. Ejemplos de tales enfermedades y trastornos incluyen, sin limitación, el cáncer y las infecciones bacterianas, víricas o fúngicas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a las variantes, anticuerpos biespecíficos, composiciones y kit de partes aquí descritos, para el tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de un humano que comprende la administración de una variante, una composición o un kit de partes descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer en un humano que comprende la administración de una variante, una composición o un kit de partes.

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad efectiva de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el propósito de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) síntomas o estados de enfermedad.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o de la porción de anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una variante, una composición o un kit de partes según cualquiera de las divulgaciones aquí descritas para su uso en un método de diagnóstico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende administrar una variante, una composición o un kit de partes según cualquiera de las divulgaciones aquí descritas a al menos una parte del cuerpo de un humano u otro mamífero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una variante, una composición o un kit de partes según cualquiera de las divulgaciones aquí descritas en la obtención de imágenes de al menos una parte del cuerpo de un humano u otro mamífero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la obtención de imágenes de al menos una parte del cuerpo de un humano u otro mamífero, que comprende la administración de una variante, una composición o un kit de partes según cualquiera de las divulgaciones aquí descritas.

Sin estar limitado por la teoría, la cantidad efectiva de un compuesto terapéuticamente activo puede ser disminuida cuando cualquier aspecto de "mutante simple" o divulgación de acuerdo con la presente invención es introducido a tal compuesto terapéuticamente activo.

Los antígenos adecuados para los anticuerpos contra el cáncer pueden ser los mismos descritos en el presente documento. Los Ejemplos 15 a 18 describen aplicaciones específicas para proporcionar una activación del complemento o CDC mejorada y/o más específica de células tumorales. Por ejemplo, un anticuerpo antitumoral según el aspecto de "mutante simple", que comprende, por ejemplo, una mutación E345R, puede proporcionar una respuesta CDC o ADCC, ADCP mejorada de las células tumorales. Además, en una variante de este método, puede añadirse a cada anticuerpo una mutación según el aspecto de "mutante simple", tal como, por ejemplo, E345R, E430, o S440S/W o cualquier otra mutación según se enumera en la Tabla 1, proporcionando así una respuesta CDC y/o ADCC mejorada dirigida específicamente a células tumorales que expresan al menos dos antígenos.

Los anticuerpos adecuados para infecciones bacterianas incluyen, sin limitación, los dirigidos contra *S. aureus*, como el pagibaximab IgG1 monoclonal quimérico (BSYX-A110; Biosynexus), dirigido contra el ácido lipoteicoico (LTA) que está embebido en la pared celular de los estafilococos, y descrito en Baker (Nat Biotechnol. 2006 Dic;24(12):1491-3) y Weisman et al. (Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44), ambos incorporados por referencia en su totalidad. El Ejemplo 14 describe una divulgación específica usando variantes de anticuerpos de *S. aureus* que comprenden una mutación E345R. Sin embargo, pueden aplicarse de manera similar otras mutaciones de la Tabla 1, incluyendo pero sin limitarse a E430G y S440W, para mejorar la capacidad mediadora de CDC de un anticuerpo frente a un antígeno bacteriano.

Los antígenos adecuados para las infecciones víricas o fúngicas pueden ser cualquiera de los aquí descritos.

En una divulgación, el antígeno al que se une la variante no es EphA2 humano. En otra divulgación, la variante no se deriva del mAb 12G3H11 de EphA2 humano (descrito en Dall'Acqua et al., *supra*, que por la presente se incorpora por referencia en su totalidad). En otra divulgación, el antígeno al que se une la variante no es IL-9. En otra divulgación, la variante no se deriva del anticuerpo Fa-hG1 o Fa-hG4 descrito en WO2007005612, que se incorpora por referencia en su totalidad, o cualquier variante del mismo. En una divulgación, el antígeno al que se une la variante no es el VIH-1 gp120. En otra divulgación, la variante no se deriva del anticuerpo IgG1k humano b12 dirigido contra gp120.

En una divulgación particular, la variante deriva de un anticuerpo progenitor biespecífico. El anticuerpo biespecífico puede ser de cualquier isotipo, tal como, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento que contenga Fc del mismo. Un método de ejemplo para preparar un anticuerpo biespecífico se describe en WO 2008/119353 (Genmab).

Dosificaciones

Debe entenderse que todas las divulgaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión. Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para el anticuerpo dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la materia. Un rango de ejemplo, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención es de aproximadamente 0.1 a 100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1 a 50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1 a 10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0.5, aproximadamente tal como 0.3, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, o aproximadamente 8 mg/kg.

Las variantes de anticuerpos de la presente invención también pueden administrarse en combinación con uno o más factores del complemento o componentes relacionados para mejorar la eficacia terapéutica de la variante y/o para compensar el consumo de complemento. Tales factores del complemento y componentes relacionados incluyen, pero no se limitan a, C1q, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, MBL y factor B. La administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial. En una divulgación particular, la invención proporciona un kit que comprende una

composición farmacéutica que comprende una variante de la invención, y al menos un factor de complemento o componente relacionado en la misma o diferente composición farmacéutica, junto con instrucciones de uso.

Las variantes de anticuerpos de la presente invención también pueden administrarse en terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes terapéuticos pertinentes para la enfermedad o afección a tratar. Por consiguiente, en una divulgación, el medicamento que contiene anticuerpos es para combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antiangiogénicos. Dicha administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial.

En una divulgación adicional, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades, como el cáncer, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante o composición farmacéutica de la presente invención, en combinación con radioterapia y/o cirugía.

Método de preparación

Debe entenderse que todas las divulgaciones descritas en el presente documento con referencia a un anticuerpo progenitor, primer anticuerpo progenitor o segundo anticuerpo progenitor también pueden ser aplicables a otros polipéptidos progenitores, primer progenitor o segundo progenitor que comprenden un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión.

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados y vectores que codifican una variante según uno cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, así como vectores y sistemas de expresión que codifican las variantes. Los constructos de ácido nucleico, vectores y sistemas de expresión adecuados para anticuerpos y variantes de los mismos son conocidos en la técnica, y se describen en los Ejemplos. En las divulgaciones en las que la variante comprende no sólo una cadena pesada (o fragmento que contiene Fc de la misma) sino también una cadena ligera, las secuencias de nucleótidos que codifican las porciones de cadena pesada y ligera pueden estar presentes en los mismos o diferentes ácidos nucleicos o vectores.

La invención también proporciona un método para producir, en una célula huésped, una variante de anticuerpo según uno cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, en el que dicha variante comprende al menos la región Fc de una cadena pesada, comprendiendo dicho método los siguientes pasos:

a) proporcionar un constructo nucleotídico que codifique dicha región Fc de dicha variante,

b) expresar dicho constructo nucleotídico en una célula huésped,

y

c) recuperar dicha variante de anticuerpo a partir de un cultivo celular de dicha célula huésped.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena pesada. Sin embargo, en la mayoría de las divulgaciones, el anticuerpo también contendrá una cadena ligera y, por lo tanto, dicha célula huésped expresa además un constructo que codifica la cadena ligera, ya sea en el mismo vector o en uno diferente.

Las células huésped adecuadas para la expresión recombinante de anticuerpos son bien conocidas en la técnica, e incluyen células CHO, HEK-293, PER-C6, NS/0 y Sp2/0. En una divulgación, dicha célula huésped es una célula que es capaz de glicosilación de proteínas enlazadas a Asn, por ejemplo, una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. En una divulgación adicional, dicha célula huésped es una célula no humana modificada genéticamente para producir glicoproteínas con glicosilación similar a la humana o humana. Ejemplos de tales células son *Pichia pastoris* modificada genéticamente (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) y *Lemna minor* modificada genéticamente (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

En una divulgación, dicha célula huésped es una célula huésped que no es capaz de eliminar eficazmente los residuos de lisina K447 C-terminales de las cadenas pesadas de anticuerpos. Por ejemplo, la Tabla 2 en Liu et al. (2008) 3 Pharm Sci 97: 2426 (incorporada aquí por referencia) enumera una serie de tales sistemas de producción de anticuerpos, por ejemplo Sp2/0, NS/0 o glándula mamaria transgénica (cabra), en los que sólo se obtiene una eliminación parcial de las lisinas C-terminales. En una divulgación, la célula huésped es una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Tales células se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que expresar variantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como EP1176195; WO03/035835; y WO99/54342. En la técnica se conocen métodos adicionales para generar glicoformas de ingeniería, e incluyen pero no se limitan a los descritos en Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473, US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; Potelligent™ technology (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); GlycoMAB™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland); US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

La invención también se refiere a un anticuerpo obtenido u obtenible por el método de la invención descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula huésped capaz de producir una variante de anticuerpo de la invención. En una divulgación, la célula huésped se ha transformado o transfectado con un constructo nucleotídico de la invención.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Diseño y generación de mutantes 7D8

El anticuerpo monoclonal humano HuMab-7D8 (descrito en WO 2004/035607) se utilizó como anticuerpo modelo. Pertenece a un grupo de anticuerpos IgG1 anti-CD20 humanos, incluyendo ofatumumab (HuMax-CD20, 2F2). Estos anticuerpos se dirigen a un epítipo proximal de membrana único en la molécula CD20 y muestran una fuerte CDC.

Para probar la relevancia funcional de las interacciones Fc-Fc oligoméricas en la activación del complemento y la CDC, se mutaron aminoácidos en el parche hidrófobo en la interfaz Fc:Fc para alterar potencialmente la interacción Fc-Fc lado a lado y la eficacia CDC de 7D8. En un primer conjunto de mutantes (**Tabla 3**), se introdujeron mutaciones para cambiar la carga en posiciones que se eligieron basándose en la estructura cristalina de 1HZH y se describieron como expuestas en parches hidrófobos en el dominio CH2-CH3 (Burton Mol Immunol 1985 Mar;22(3):161-206)).

Del primer conjunto de mutaciones, se encontró que I253D y H433A inducían el efecto más fuerte sobre la pérdida de CDC por 7D8 (por ejemplo, Ejemplo 5). La estructura cristalina de 1HZH muestra que I253 y H433 se unen a dos bolsillos diferentes en las posiciones Fc opuestas del anticuerpo colaborador. Basándose en estos datos, se sintetizó un segundo conjunto de mutaciones, alrededor de las posiciones I253 y H433 en la estructura cristalina para estudiar más a fondo la importancia de los residuos en la interfaz Fc:Fc lado a lado para CDC. El segundo conjunto de mutaciones alrededor de las posiciones I253 y H433 que potencialmente desestabilizan la interfaz Fc:Fc y, en consecuencia, la CDC se enumeran en la Tabla 4.

Para excluir la posibilidad de que la interrupción de los sitios de unión directa para C1q fueran la causa de los efectos observados en CDC, se generó un mutante doble basado en dos mutantes simples que mostraban pérdida de CDC, para probar su capacidad de restaurar la pérdida de CDC por los mutantes simples. Este principio se representa esquemáticamente en la **Figura 1D**. El mutante doble se enumera en la **Tabla 5** y su representación estructural se muestra en la Figura 4 y la Figura 5.

Los mutantes se prepararon utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, EE.UU.). En resumen, se utilizaron un cebador directo y un cebador inverso que codificaban la mutación deseada para replicar una plantilla de ADN plasmídico de longitud completa que codificaba la cadena pesada 7D8 con alotipo IgG1m(f). La mezcla de ADN resultante se digirió usando DpnI para eliminar el ADN plasmídico de origen y se utilizó para transformar E. coli. El ADN plasmídico mutante aislado de las colonias resultantes se comprobó mediante secuenciación del ADN (Agowa, Alemania). Las mezclas de ADN plasmídico que codifican tanto la cadena pesada como la ligera de los anticuerpos se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectin (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente según lo descrito por el fabricante.

Tabla 3: Mutaciones del conjunto 1 introducidas en el dominio CH2-CH3 de 7D8.

Mutación	Carga WT	Carga mutante aa
I253D	=	-
I253Y	=	=
I253A	=	=
Q311A	=	=
H433A	δ+	=
N434A	=	=
H435A	Δ+	=
H435R	δ+	+

(=) sin carga

(-) carga negativa

(+) carga positiva

(δ+) carga positiva parcial

Tabla 4: Mutaciones del conjunto 2 introducidas en el dominio CH2-CH3 de 7D8.

Mutaciones	Carga WT aa	Carga mutante aa
I253K	=	+
I253R	=	+
I253D/H433A	= / δ+	- / =
H310E	δ+	-
H310R	δ+	+
H310K	δ+	+
Q311K	=	+
K322A	+	=
E345R	-	+
E382R	-	+
G385D	=	-
H433D	δ+	-
H433R	δ+	+
Y436C	=	=
Y436D	=	-
Q438D	=	-
K439E	+	-
S440K	=	+

(=) sin carga
 (-) carga negativa
 (+) carga positiva
 (δ+) carga positiva parcial

Tabla 5: Mutaciones dobles introducidas en el dominio CH2-CH3 de 7D8 para combinar dos mutaciones simples que muestran cada una pérdida de CDC.

Mutaciones	Carga WT aa	Carga mutante aa
K439E/S440K	+ / =	- / +

(=) sin carga
 (-) carga negativa
 (+) carga positiva

Ejemplo 2

Unión de CD20 en células por mutantes 7D8

La unión de muestras de anticuerpos purificados a células CD20-positivas se analizó mediante análisis FACS. El 1^{er} conjunto de mutaciones (Tabla 3) se probó en células Daudi y el segundo conjunto de mutaciones (Tabla 4) se probó en células Raji. Se incubaron 10⁵ células en 50 µL en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner bio-one 650101) con diluciones seriadas de preparaciones de anticuerpos (rango de 0.04 a 10 µg/mL en diluciones de 3 veces para el 1^{er} conjunto en Daudi y rango de 0.003 a 10 µg/mL en diluciones de 3 veces para el 2^{do} conjunto en Raji) en RPMI1640/0.1% BSA a 4°C durante 30 min. Después de lavar dos veces en RPMI1640/0.1% BSA, las células se incubaron en 100 µL con anticuerpo secundario a 4°C durante 30 min. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG antihumana de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (F0056, Dako, Glostrup, Dinamarca; 1/100) para todos los experimentos con células Daudi y para los experimentos con anticuerpos 7D8 en células Raji. Para los experimentos con anticuerpos 7D8 purificados en células Raji, se usó cadena ligera kappa antihumana F(ab')₂ de cabra conjugada con R-ficoeritrina (R-PE) (2062-09, Southern Biotech; 1/500) como anticuerpo secundario. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/0.1% BSA/0.02% azida, se resuspendieron en 100 µL de

PBS/0.1% BSA/0.02% azida y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La unión del anticuerpo 7D8 a las células Daudi no se vio afectada por la introducción de las mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3 y fue idéntica para todos los mutantes probados y el 7D8 de tipo silvestre. Además, la unión del anticuerpo 7D8 a las células Raji no se vio afectada significativamente por la introducción de las mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3 en comparación con el 7D8 de tipo silvestre, excepto para E345R. Se detectó una disminución de la unión de IgG1-7D8-E345R en células Raji CD20-positivas a concentraciones de ensayo superiores a 0.3 µg/mL. También para H433D y H433R se detectó una disminución de la unión a la concentración más alta de anticuerpo probada (10 µg/mL). La disminución de la unión de IgG1-7D8-E345R, H433D y H433R podría explicarse por el blindaje del epítipo del anticuerpo secundario, ya que el marcaje directo de E345R y H433R dio lugar a una unión similar o incluso mayor a las células Daudi. La mayor avidez puede explicarse por la mayor unión a Fc-Fc lado a lado de E345R y H433R en comparación con la IgG1-7D8 de tipo silvestre.

La combinación de las mutaciones K439E y S440K no afectó la unión del anticuerpo 7D8 a las células Raji y fue idéntica a la de los mutantes individuales y 7D8 de tipo silvestre.

Ejemplo 3

ELISA de unión a C1q por mutantes 7D8

La unión a C1q por los mutantes 7D8 se probó en un ELISA, en el que los anticuerpos purificados se recubrieron en la superficie de plástico, provocando la multimerización aleatoria del anticuerpo. Se utilizó suero humano mezclado como fuente de C1q.

Las placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) se recubrieron durante la noche a 4°C con una serie de diluciones de los anticuerpos en PBS (rango 0.58-10.0 µg/mL en diluciones de 1.5 veces). Las placas se lavaron y se bloquearon con 200 µL/pocillo de PBS 0.5x suplementado con Tween 20 al 0.025% y gelatina al 0.1%. Con lavados entre incubaciones, las placas se incubaron secuencialmente con suero humano al 3% (Sanquin, producto# M0008) durante 1 h a 37°C, con 100 µL/pocillo de C1q antihumano de conejo (DAKO, producto# A0136, 1/4.000) durante 1 h a TA, y con 100 µL/pocillo de IgG-HRP anticonejo de cerdo (DAKO, P0399, 1:10.000) como anticuerpo detector durante 1 h a TA. El revelado se realizó durante aproximadamente 30 min con 1 mg/mL de 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La reacción se detuvo añadiendo 100 µL de ácido oxálico al 2%. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT). Los datos transformados logarítmicamente se analizaron ajustando curvas sigmoidales dosis-respuesta con pendiente variable utilizando el software GraphPad Prism. Los valores de EC₅₀ de los mutantes se normalizaron por placa frente a IgG1-7D8 de tipo silvestre y se multiplicaron el promedio de todos los datos de IgG1-7D8 de tipo silvestre.

Como se muestra en la Figura 6 y la Tabla 6, las mutaciones puntuales probadas tuvieron un efecto mínimo sobre la unión a C1q medida por ELISA. Para el mutante IgG1-7D8-I253D, se midió una unión C1q ligeramente menos eficiente en el ELISA (valor EC₅₀ más alto). Se comprobó la eficacia de recubrimiento de todos los anticuerpos y se observó que era similar en todos ellos.

Tabla 6: EC₅₀ para la unión a C1q en ELISA

Anticuerpo	EC ₅₀ (µg/mL) ¹	media SD ¹	Significancia ²
IgG1-7D8-WT	2.048	0	Na
IgG1-7D8-I253D	3.838	1.341	*
IgG1-7D8-I253Y	2.209	0.385	Ns
IgG1-7D8-I253A	2.556	0.187	Ns
IgG1-7D8-Q311A	2.182	0.062	ns
IgG1-7D8-H433A	3.327	1.719	ns
IgG1-7D8-N434A	2.120	0.492	ns
IgG1-7D8-H435A	2.267	0.317	ns
IgG1-7D8-H435R	1.242	0.492	ns

¹ La media y la SD se calcularon a partir de al menos 3 experimentos.

² Estadística: ANOVA de 1 vía sobre datos transformados logarítmicamente utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (GraphPad Prism 5.01). La significación se calculó en comparación con la IgG1-7D8 de tipo silvestre: (na) no aplicable (ns) no significativo (*) p=0.01 a 0.05 (**) p=0.001 a 0.01 (***) p<0.001.

Ejemplo 4

Unión a C1q en células por mutantes 7D8

El recubrimiento de anticuerpos sobre una superficie plástica da lugar a un sistema estático artificial de unión de anticuerpos y presentación de colas Fc. Por lo tanto, la unión del complemento también se probó en un ensayo basado en células, en el que la unión a C1q a células B CD20 positivas opsonizadas con anticuerpos se midió mediante análisis FACS. En los experimentos con mutantes del conjunto 1, las células Daudi o Raji se suspendieron en hielo en 90 μ L de medio RPMI 1640 con un 10% de FBS (2×10^6 células/mL). Se añadieron 10 μ L de una serie de concentraciones de C1q (Complement Technologies, Tyler, TX) (el rango de concentración final varía entre 0-60 μ g/mL y 0-140 μ g/mL dependiendo de la unión máxima). A continuación, se añadieron 10 μ L de anticuerpo purificado (concentración final de 10 μ g/mL, es decir, condiciones de saturación) y las mezclas de reacción se transfirieron inmediatamente a un baño de agua a 37 °C y se incubaron durante una hora. En los experimentos con mutantes del conjunto 2, el mAb de prueba se añadió a células Daudi a granel, después se añadieron concentraciones variables de C1q a alícuotas y las mezclas se incubaron como se ha indicado anteriormente. Las células se lavaron tres veces con PBS/1% BSA y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo anti-C1q de conejo marcado con FITC (DakoCytomation, 10 μ g/mL). Las células se lavaron con PBS/1%BSA y se resuspendieron en PBS o se fijaron en formaldehído al 2% en PBS. La citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y las intensidades medias de fluorescencia se convirtieron en moléculas de fluorescencia soluble equivalente (MESF) utilizando perlas calibradas (Spherotech).

Las constantes de disociación (valores K_D) para la unión a C1q a células CD20-positivas opsonizadas con los anticuerpos 7D8 indicados se calcularon utilizando el software SigmaPlot® (Systat Software Inc., Washington). Los valores promedio de K_D se calcularon a partir de experimentos de unión repetidos (4 veces en células Daudi, 3 veces en células Raji) y se compararon con el valor de K_D para la unión a C1q en células opsonizadas con 7D8 de tipo silvestre (Tabla 7 y Tabla 8).

Los mutantes del conjunto 1 fueron probados tanto en células Daudi como Raji y dieron los mismos resultados. En contraste con los resultados de C1q ELISA, la mayoría de los mutantes probados mostraron una menor avidéz de unión a C1q (K_D aumentado) tanto en células Daudi opsonizadas con anticuerpo (Tabla 7A) como en células Raji (Tabla 8). En comparación con el 7D8 de tipo silvestre, IgG1-7D8-Q311A y H435A mostraron una disminución mínima o nula, I253A, I253Y y N434A una disminución más pronunciada, e I253D y H433A una disminución muy drástica de la avidéz de unión a C1q en células Daudi o Raji opsonizadas. La IgG1-7D8-H435R mostró una avidéz ligeramente superior (K_D inferior) para la unión a C1q que el 7D8 de tipo silvestre en ambos tipos celulares, que, sin embargo, no fue significativa.

Los mutantes del conjunto 2 se probaron en células Daudi. En comparación con el 7D8 tipo silvestre, IgG1-7D8-E345R, E382R y H433R mostraron una mayor avidéz de unión en células Daudi opsonizadas, reflejada por los valores K_D inferiores (Tabla 7B). Todos los demás mutantes del conjunto 2 mostraron una menor avidéz de unión en comparación con el 7D8 de tipo silvestre, con G385D, Y436D, Q438D, K439E y S440K mostrando valores K_D drásticamente aumentados (Tabla 7B) y H433D e Y436C mostrando una unión tan drásticamente reducida que no se pudo medir un valor K_D fiable.

El mutante doble IgG1-7D8-K439E/S440K mostró una unión C1q restaurada en células Daudi opsonizadas con anticuerpo, mientras que ambos mutantes simples mostraron una unión C1q disminuida en comparación con el 7D8 de tipo silvestre. La avidéz de unión del mutante doble K439E/S440K incluso aumentó ligeramente en comparación con el 7D8 de tipo silvestre (Tabla 7C). Las mezclas de mutantes simples IgG1-7D8-K439E e IgG1-7D8-K440E fueron capaces de restaurar completamente la unión a C1q, que fue comparable a la unión a C1q del 7D8 de tipo silvestre (Tabla 7C).

La discrepancia entre la unión a C1q sin cambios en el ELISA (Ejemplo 3) y la unión a C1q afectada en el ensayo celular por los mutantes IgG1-7D8, muestra que las posiciones CH3 probadas que están implicadas en la interacción Fc:Fc entre moléculas de anticuerpo, no influyen directamente en la unión a C1q, pero son determinantes importantes que afectan al posicionamiento dinámico de las colas Fc del anticuerpo cuando se unen a las células, y por tanto también a la fuerza de la unión a C1q.

Tabla 7A: Valores de K_D para la unión a C1q a células Daudi opsonizadas con anticuerpos (conjunto 1 de mutantes)

mAb	K_D (nM) Exp.1	K_D (nM) Exp.2	K_D (nM) Exp.3	K_D (nM) Exp.4	K_D (nM) Exp. 10	K_D (nM) Exp. 11	Promedio K_D (nM)	sd	Valor P*
7D8	7.7	9.3	4.2	4.3	11.8	13.3	8.4	3.7	na**
7D8-I253A	33.0	20.4	16.7	15.7			21.5	8.0	0.007
7D8-I253Y	58.5	37.0	21.1	48.7			41.3	16.1	0.001

mAb	K _D (nM) Exp.1	K _D (nM) Exp.2	K _D (nM) Exp.3	K _D (nM) Exp.4	K _D (nM) Exp. 10	K _D (nM) Exp. 11	Promedio K _D (nM)	sd	Valor P*
7D8-I253D	146.5	176.1	101.7	205.2			157.4	44.2	<0.001
7D8-Q311A	14.3	13.0	9.6	5.9			10.7	3.8	0.379
7D8-H433A	168.0	76.1	45.2	180.7			117.5	67.0	0.003
7D8-N434A	36.7	47.8	28.3	48.7			42.6	9.7	<0.001
7D8-H435A	7.8	10.9	5.0	10.9			8.6	2.8	0.925
7D8-H435R	5.2	8.7	2.6	3.0			4.9	2.8	0.147

* Comparado con 7D8 tipo silvestre (prueba t)

** (na) no aplicable

Tabla 7B: Valores de K_D para la unión a C1q a células Daudi opsonizadas con anticuerpos (conjunto 2 de mutantes)

mAb	K _D (nM) Exp.5	K _D (nM) Exp.6	K _D (nM) Exp.7	K _D (nM) Exp.8	K _D (nM) Exp.9	K _D (nM) Exp.10	K _D (nM) Exp.11	Promedio K _D (nM)	sd	Valor P *
Ofatumumab	6	5.4	4	2.7	12.47	12.8		7.2	4.3	0.6192
7D8						11.8	13.3	8.4***	3.7	na**
7D8-H310K	32.4						216	124	130	0.0371
7D8-E345R	3.5		0.17	0.35		2.7		1.7	1.7	0.0106
7D8-E382R		3.5	1.18	1.13		3.3		2.3	1.3	0.0150
7D8-G385D		77					71	74	4	< 0.0001
7D8-H433D****		(1227)					(2694)	(1961)	1037	0.0013
7D8-H433R		5.2	0.72	1.78	5.69	1.6		3	2.3	0.0205
7D8-Y436C****	(2420)						(128)	(1274)	1621	0.0576
7D8-Y436D		431					504	468	52	< 0.0001
7D8-Q438D	767						667	717	70	< 0.0001
7D8-K439E		418					304	361	81	< 0.0001
7D8-S440K		170					48	109	87	0.0131
7D8-1253D/H433A		10316 ¹					246	5291	7106	0.0681

* Comparado con el 7D8 tipo silvestre (prueba t)

** (na) no aplicable

*** K_D promedio de 7D8 se calculó a partir de los experimentos 1,2,3,4, 10 y 11.

**** No se pudo medir una curva de ajuste confiable ni un valor de K_D debido a la unión demasiado débil de estos mutantes.

Tabla 7C: Valores de K_D para la unión a C1q a células Daudi opsonizadas con anticuerpos (mutante doble)

mAb	K _D (nM) Exp.5	K _D (nM) Exp.6	K _D (nM) Exp.7	K _D (nM) Exp.8	K _D (nM) Exp.9	K _D (nM) Exp.10	K _D (nM) Exp.11	Promedio K _D (nM)	sd	Valor P *
7D8						11.8	13.3	804***	3.7	na**
7D8-K439E		418					304	361	81	< 0.0001
7D8-S440K		170					48	109	87	0.0131
7D8-K439E/S440K		4.6	1.63	1.01		2.9		2.6	1.6	0.0196

mAb	K _D (nM) Exp.5	K _D (nM) Exp.6	K _D (nM) Exp.7	K _D (nM) Exp.8	K _D (nM) Exp.9	K _D (nM) Exp.10	K _D (nM) Exp.11	Promedio K _D (nM)	sd	Valor P *
Mezcla 7D8-K439E + 7D8-S440K		3.6	3.05			3.1		3.3	0.3	0.0555

* Comparado con el 7D8 tipo silvestre (prueba t)

** (na) no aplicable

*** K_D promedio de 7D8 se calculó a partir de los experimentos 1,2,3,4, 10 y 11.

Tabla 8: Valores de K_D para la unión a C1q a células Raji opsonizadas con anticuerpos (conjunto 1 de mutantes)

mAb	K _D (nM) Exp.1	K _D (nM) Exp.2	K _D (nM) Exp.3	Promedio K _D (nM)	sd	P-value*
7D8	4.8	7.0	10.9	6.5	3.1	na**
7D8-I253A	10.0	25.7	20.1	18.6	7.9	0.020
7D8-I253Y	24.3	45.6	46.2	38.7	12.4	0.001
7D8-I253D	70.0	172.0	85.2	109.1	55.0	0.005
7D8-Q311A	4.1	10.1	12.2	9.1	3.5	0.280
7D8-H433A	124.8	85.0	84.0	97.9	23.3	<0.001
7D8-N434A	35.9	46.7	35.2	44.9	12.5	<0.001
7D8-H435A	5.4	9.9	6.6	7.3	2.3	0.721
7D8-H435R	3.5	6.2	4.5	4.7	1.4	0.721

Comparado con el 7D8 tipo silvestre (prueba t)

** (na) no aplicable

Ejemplo 5

5 Eficacia de C1q por mutantes 7D8 en un ensayo CDC en células Raji CD20-positivas.

La eficacia de C1q utilizando células opsonizadas con mutantes IgG1-7D8 se probó en un ensayo CDC para investigar el impacto de los cambios observados en la avidéz de unión a C1q sobre la actividad CDC. Por lo tanto, se realizó un ensayo CDC utilizando suero humano normal empobrecido en C1q que se suplementó con una serie de concentraciones definidas de C1q. Se preincubaron 0.1×10^6 células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc, Rochester, NY) con 10 µg/mL de anticuerpo purificado y una serie de concentraciones de C1q humano (0.005, 0.025, 0.1, 0.3, 1.0, 5.0, 30.0 µg/mL) a TA durante 15 min en un volumen total de 100 µL de medio RPMI1640, suplementado con 0.1% de BSA. A continuación, se añadieron 25 µL de suero empobrecido en C1q (Quidel, San Diego, CA) y se incubaron a 37°C en un baño de agua durante 30 min o en una incubadora durante 45 min. Tras la incubación, se detuvo la reacción colocando las muestras en hielo. La lisis celular se determinó en FACS mediante el ensayo de exclusión de células viables con yoduro de propidio (PI, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). El % de lisis se determinó de la siguiente manera % de lisis = (número de células PI pos/número total de células) × 100%.

La lisis por el 7D8 de tipo silvestre en presencia de 30 µg/mL de C1q menos la lisis cuando no se agregó C1q, se fijó en 100%. Los valores de CH₅₀ (la concentración de C1q que produce un 50% de lisis) se calcularon ajustando curvas sigmoidales dosis-respuesta a datos transformados logarítmicamente mediante el software GraphPad Prism. Los valores de CH₅₀ de los mutantes se normalizaron con respecto al 7D8 de tipo silvestre (Tabla 9).

Los datos de la Tabla 9 muestran que, de acuerdo con las mediciones de avidéz de unión a C1q, las IgG1-7D8-Q311A, E382R y H435A no mostraron una disminución de la eficacia de C1q; I253A, I253Y, G385D, N434A e Y436C una disminución significativa de la eficacia de C1q; e I253D, H310K, K322A, H433A, H433D, Y436D, Q438D, K439E y S440K perdieron casi por completo la capacidad de inducir CDC con todas las concentraciones de C1q probadas.

IgG1-7D8-H435R y H433R utilizaron C1q ligeramente más eficiente, lo que resultó en CDC más eficiente que el 7D8 de tipo silvestre. IgG1-7D8-E345R mostró un aumento drástico de la eficacia de C1q, lo que dio lugar a una lisis CDC significativamente mayor en comparación con el 7D8 de tipo silvestre (Tabla 9).

La Figura 7 muestra que la combinación de la mutación K439E y S440K, que ambas resultan en la pérdida de CDC como un mutante simple, restauró la CDC en el ensayo de eficacia C1q cuando ambas mutaciones se combinaron en una molécula (mutante doble K439E/S440K) o cuando se combinaron ambos mutantes simples (mezcla K439E + S440K).

Tabla 9: CH₅₀ para la eficacia de C1q en un ensayo CDC en células Raji

Anticuerpo	n ⁽¹⁾	CH ₅₀ media (µg/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	Significancia ⁽³⁾
IgG1-7D8-WT	8	0.49	0.26	na
IgG1-7D8-I253A	3	11.16	16.31	***
IgG1-7D8-I253D	3	>30 ⁽⁴⁾	0.00	nd
IgG1-7D8-I253Y	3	16.07	12.50	***
IgG1-7D8-H310K	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-Q311A	3	0.63	0.58	ns
IgG1-7D8-K322A	6	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-E345R	3	0.03	0.01	***
IgG1-7D8-E382R	3	0.77	0.476	ns
IgG1-7D8-G385D	3	22.51	12.97	***
IgG1-7D8-H433A	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-H433D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-H433R	3	0.16	0.09	ns
IgG1-7D8-N434A	3	21.16	15.32	***
IgG1-7D8-H435A	3	0.96	0.20	ns
IgG1-7D8-H435R	3	0.24	0.15	ns
IgG1-7D8-Y436C	3	23.03	12.07	***
IgG1-7D8-Y436D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-Q438D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-K439E	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-S440K	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-1253D/H433A	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-K439E/S440K	3	0.09	0.71	ns
Mezcla IgG1-7D8-K439E + IgG1-7D8-S440K	3	1.33	1.48	ns

⁽¹⁾ (n) Número de experimentos

⁽²⁾ La media y la SD se calcularon a partir de todos los experimentos realizados.

⁽³⁾ Estadística: ANOVA de 1 vía sobre datos transformados logarítmicamente utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (GraphPad Prism 5.01). La significación se calculó en comparación con la IgG1-7D8 de tipo silvestre: (na) no aplicable (nd) no determinado (ns) no significativo (*) p=0.01 a 0.05 (**) p=0.001 a 0.01 (***) p<0.001.

⁽⁴⁾ Cuando la lisis no alcanzó el 50%, la CH₅₀ se fijó en >30 µg/mL.

⁽⁵⁾ No se pudo determinar un valor P para los mutantes que no alcanzaron el 50% de lisis. Sin embargo, se supone que son significativamente diferentes de IgG1-7D8-WT.

Ejemplo 6

CDC por mutantes 7D8 en un ensayo CDC en células CD20-positivas

Se preincubaron 0.1×10^6 células en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc, Rochester, NY) con series de concentración de anticuerpos (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 µg/mL) en un volumen total de 80 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 20 µL de suero humano normal como fuente de C1q (concentración final del 20%) y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 30 µL de medio RPMI helado, suplementado con 0.1% de BSA. La lisis celular se determinó en FACS utilizando yoduro de propidio.

Para los ensayos CDC en células Daudi, los valores EC₅₀ (la concentración de anticuerpo que resulta en 50% de lisis) se calcularon a partir del ajuste de curvas sigmoidales dosis-respuesta en datos log-transformados usando el software GraphPad Prism. Los valores de EC₅₀ de los mutantes se normalizaron con respecto al 7D8 de tipo silvestre (Tabla 10 y Tabla 11).

La Tabla 10 muestra que en células Daudi, IgG1-7D8-I253A, Q311A, E382R, H433R y H435A no mostraron diferencia en CDC en comparación con el 7D8 de tipo silvestre; se encontró una CDC significativamente peor (EC₅₀ mayor) que

el 7D8 de tipo silvestre para IgG1-7D8-I253D, I253Y, H310K, G385D, H433A, H433D, N434A, Y436C, Y436D, Q438D, K439E, S440K e I253D/H433A, que sólo indujeron CDC a concentraciones de anticuerpos más altas; La IgG1-7D8-K322A, mutante deficiente en la unión a C1q, que se incluyó como control, perdió casi por completo la capacidad de inducir la CDC y no alcanzó la EC_{50} a las concentraciones probadas; la IgG1-7D8-H435R mostró una CDC más eficaz que la 7D8 DE de tipo silvestre en células Daudi. Es importante destacar que, de acuerdo con el ensayo CDC de eficacia C1q, E345R mostró una CDC drásticamente mejor que el 7D8 de tipo silvestre con un valor EC_{50} 10 veces menor en células Daudi (Tabla 10). La Figura 8 muestra que la combinación de las mutaciones K439E y S440K, que provocan la pérdida de CDC como mutante simple, restauró la CDC cuando ambas mutaciones se combinaron en una molécula (mutante doble K439E/S440K) o cuando se combinaron ambos mutantes simples (mezcla K439E + S440K).

La Tabla 11 muestra que se encontraron datos similares para los mutantes IgG1-7D8 en células Raji.

Tabla 10: EC_{50} calculada a partir del ensayo CDC en células Daudi

Anticuerpo	n ⁽¹⁾	EC_{50} media (μ g/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	Significancia ⁽³⁾
IgG1-7D8	12	0.48	0.11	na
IgG1-7D8-I253A	4	0.79	0.15	ns
IgG1-7D8-I253D	5	3.33	1.05	***
IgG1-7D8-I253Y	4	1.77	0.43	***
IgG1-7D8-H310K	3	3.03	0.30	***
IgG1-7D8-Q311A	4	0.42	0.12	ns
IgG1-7D8-K322A		>30 ⁽⁴⁾	Nd	*** ⁽⁵⁾
IgG1-7D8-E345R	4	0.04	0.01	***
IgG1-7D8-E382R	4	0.76	0.25	ns
IgG1-7D8-G385D	3	2.12	0.45	***
IgG1-7D8-H433A	5	3.44	1.17	***
IgG1-7D8-H433D	4	4.73	2.57	***
IgG1-7D8-H433R	4	0.33	0.14	ns
IgG1-7D8-N434A	4	1.77	0.46	***
IgG1-7D8-H435A	4	0.81	0.27	ns
IgG1-7D8-H435R	5	0.28	0.06	**
IgG1-7D8-Y436C	4	1.90	1.21	***
IgG1-7D8-Y436D	3	1.88	0.45	***
IgG1-7D8-Q438D	3	2.61	0.38	***
IgG1-7D8-K439E	4	2.34	0.38	***
IgG1-7D8-S440K	4	1.78	0.46	***
IgG1-7D8-I253D/H433A	4	4.77	1.36	***
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	0.33	0.08	ns
IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	4	0.48	0.17	ns

⁽¹⁾ (n) Número de experimentos

⁽²⁾ La media y la SD se calcularon a partir de todos los experimentos realizados.

⁽³⁾ Estadística: ANOVA de 1 vía sobre datos transformados logarítmicamente utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (GraphPad Prism 5.01). La significación se calculó en comparación con el 7D8 de tipo silvestre: (na) no aplicable (nd) no determinado (ns) no significativo (*) $p=0.01$ a 0.05 (**) $p=0.001$ a 0.01 (***) $p<0.001$.

⁽⁴⁾ Cuando la lisis no alcanzó el 50%, la EC_{50} se fijó en $>30 \mu$ g/mL.

Tabla 11: EC_{50} calculada a partir del ensayo CDC en células Raji

Anticuerpo	n ⁽¹⁾	EC_{50} media (μ g/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	Significance ⁽³⁾
IgG1-7D8	13	1.54	0.77	Na
IgG1-7D8-I253A	4	5.55	3.19	*

Anticuerpo	n ⁽¹⁾	EC ₅₀ media (µg/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	Significance ⁽³⁾
IgG1-7D8-I253D	6	>30 ⁽⁴⁾	0.00	*** ⁽⁵⁾
IgG1-7D8-I253Y	4	28.95	2.09	***
IgG1-7D8-H310K	2	19.29	15.15	***
IgG1-7D8-Q311A	4	1.72	0.42	Ns
IgG1-7D8-K322A		>30		***
IgG1-7D8-E345R	4	0.16	0.09	***
IgG1-7D8-E382R	4	2.96	1.27	Ns
IgG1-7D8-G385D	2	17.40	17.82	***
IgG1-7D8-H433A	6	22.60	9.30	***
IgG1-7D8-H433D	4	>30	0.00	***
IgG1-7D8-H433R	4	1.42	0.67	Ns
IgG1-7D8-N434A	4	23.02	6.16	***
IgG1-7D8-H435A	4	2.22	1.47	Ns
IgG1-7D8-H435R	6	0.61	0.21	**
IgG1-7D8-Y436C	2	11.93	10.13	**
IgG1-7D8-Y436D	2	16.58	3.93	***
IgG1-7D8-Q438D	2	19.49	14.87	***
IgG1-7D8-K439E	4	21.51	9.96	***
IgG1-7D8-S440K	4	19.53	12.71	***
IgG1-7D8-I253D/H433A	4	>30	0.00	***
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	1.34	0.45	Ns
IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	4	1.58	0.64	Ns

⁽¹⁾ (n) Número de experimentos

⁽²⁾ La media y la DE se calcularon a partir de todos los experimentos realizados.

⁽³⁾ Estadística: ANOVA de 1 vía sobre datos transformados logarítmicamente utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (GraphPad Prism 5.01). La significación se calculó en comparación con el 7D8 de tipo silvestre: (na) no aplicable (nd) no determinado (ns) no significativo (*) p=0.01 a 0.05 (**) p=0.001 a 0.01 (***) p<0.001.

⁽⁴⁾ Cuando la lisis no alcanzó CH₅₀, la CH₅₀ se fijó en >30 µg/mL.

⁽⁵⁾ No se pudo determinar un valor P para los mutantes que no alcanzaron la EC₅₀. Sin embargo, se supone que son significativamente diferentes de 7D8-WT silvestre.

10 Ejemplo 7

Clasificación de los mutantes 7D8 según su capacidad de inducir CDC

Para los mutantes 7D8 probados, se encontró una correlación entre la unión C1q en células Daudi (descrita en el Ejemplo 4) y ensayos de eficacia C1q en células Raji (descritos en el Ejemplo 5), y entre la unión C1q en células Daudi y ensayos CDC en células Daudi y Raji (descritos en el Ejemplo 6) (datos de correlación Tabla 13). Por consiguiente, los valores K_D de los ensayos de unión a C1q en células Daudi se utilizaron para clasificar todos los mutantes 7D8 ensayados según su capacidad para inducir CDC, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Clasificación de todos los mutantes 7D8 ensayados según valores descendentes de K_D para la unión a C1q en células Daudi, que sirven como representante de su capacidad para inducir CDC.

Anticuerpo	Unión a C1q en células Daudi		
	n ⁽¹⁾	K _D (nM) ⁽²⁾	SD
IgG1-7D8-E345R	4	1.7	1.7
IgG1-7D8-E382R	4	2.3	1.3
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	2.6	1.6
IgG1-7D8-H433R	5	3.0	2.3

IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	3	3.3	0.3
IgG1-7D8-H435R	3	4.9	2.8
IgG1-7D8-H435A	3	8.6	2.8
IgG1-7D8	7	8.7	3.5
IgG1-7D8-Q311A	3	10.7	3.8
IgG1-7D8-I253A*	3	21.5	8.0
IgG1-7D8-I253Y*	3	41.3	16.1
IgG1-7D8-N434A*	3	42.6	9.7
IgG1-7D8-G385D*	2	74.0	4.0
IgG1-7D8-S440K*	2	109.0	87.0
IgG1-7D8-H433A*	3	117.5	16.1
IgG1-7D8-H310K*	2	124.0	130.0
IgG1-7D8-I253D*	3	157.4	44.2
IgG1-7D8-K439E*	2	361.0	81.0
IgG1-7D8-Y436D*	2	468.0	52.0
IgG1-7D8-Q438D*	2	717.0	70.0
IgG1-7D8-Y436C*	2	(1274.0)	1621.0
IgG1-7D8-H433D*	2	(1961.0)	1037.0
IgG1-7D8-I253D/H433A*	2	(5291.0)	7106.0

* Curva de ajuste no fiable. Los valores K_D en cursiva no pudieron medirse debido a la unión demasiado débil de estos mutantes.

5 Tabla 13: correlación entre la unión a C1q en células Daudi (Ejemplo 4) y ensayos de eficacia de C1q en células Raji (Ejemplo 5), y entre la unión a C1q en células Daudi y ensayos CDC en células Daudi y Raji (Ejemplo 06). Los datos se transformaron logarítmicamente antes de analizar la correlación.

Parámetro	C1q eficacia Raji	CDC Raji	CDC Daudi
Número de pares XY	21	21	21
Pearson r	0.8600	0.8668	0.8959
Intervalo de confianza del 95	0.6812 a 0.9420	0.6952 a 0.9449	0.7569 a 0.9573
Valor P (dos colas)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Resumen del valor P	***	***	***
¿Es significativa la correlación?			
(alfa=0.05)	Sí	Sí	Sí
R al cuadrado	0.7396	0.7513	0.8026

Ejemplo 8

Diseño y generación de mutantes del anticuerpo CD38 005

10 El anticuerpo monoclonal humano HuMab 005 es un anticuerpo IgG1, κ totalmente humano descrito en WO/2006/099875. Aquí, se utilizó como anticuerpo modelo para la validación de las mutaciones Fc identificadas para mejorar la actividad CDC. Las mutaciones probadas se enumeran en la Tabla 14.

15 Se prepararon constructos de ADN para los diferentes mutantes y se transfectaron transitoriamente como se describe en el Ejemplo 1, utilizando la cadena pesada de HuMab 005 con alotipo IgG1m(f) como plantilla para las reacciones de mutagénesis.

Tabla 14: conjunto de mutaciones que se introdujeron en el dominio CH2-CH3 de 005 (HuMax-CD38).

Mutación	Carga WT aa	Carga mutante aa
I253D	=	-

Mutación	Carga WT aa	Carga mutante aa
E345R	-	+
H433A	δ+	=
K439E	+	-
S440K	=	+

(=) sin carga

(-) carga negativa

(+) carga positiva

(δ+) carga positiva parcial

5 Ejemplo 9

Unión a CD38 en células por mutantes de HuMab-005

La unión de muestras de anticuerpos no purificados a células Daudi y Raji CD38-positivas se analizó mediante análisis FACS. Se incubaron 10^5 células en 100 μ L en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno con diluciones seriadas de preparaciones de anticuerpos (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL) en RPMI1640/0.1% BSA a 4°C durante 30 min. Tras lavarlas dos veces en RPMI1640/0.1% BSA, las células se incubaron en 50 μ L con IgG antihumana de conejo F(ab')₂ conjugada con FITC (cat.no. F0056; DAKO; 1:150) a 4 °C durante 30 min. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/0.1% BSA/0.02% azida, se resuspendieron en 100 μ L de PBS/0.1% BSA/0.02% azida y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron utilizando el software GraphPad Prism V5.01. Como control negativo, se utilizó el sobrenadante de células transfectadas simuladas.

La unión de HuMab 005 a células Daudi no se vio muy afectada por la introducción de mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3. Todos los anticuerpos probados se unieron a las células Daudi de una manera dependiente de la dosis. La unión fue similar a la del HuMab-005 de tipo silvestre para todos los mutantes probados, con la excepción del 005-E345R, que mostró una unión ligeramente disminuida. Sin embargo, sin estar sujeto a ninguna teoría, la menor unión podría ser el resultado de una menor unión por el anticuerpo secundario, de forma análoga a IgG1-7D8-E345 en el Ejemplo 2. La avidéz de unión real por 005-E345R podría ser similar o incluso mayor en comparación con 005-WT, sin embargo, no pudimos confirmarlo debido a la falta de anticuerpos marcados directamente.

La unión de HuMab-005 a células Raji tampoco se vio muy afectada por la introducción de mutaciones puntuales en el dominio CH2-CH3. Todos los anticuerpos probados se unieron a las células Raji de una manera dependiente de la dosis. La unión máxima fue similar a la del 005 silvestre para los mutantes 005-I253D y H433A y menor para los mutantes 005-E435R, K439E, S440K y la combinación de 005-K439E + 005-S440K. Sin embargo, sin estar sujeto a ninguna teoría, la menor unión podría ser el resultado de una menor unión por parte del anticuerpo secundario, de forma análoga a IgG1-7D8-E345R en el ejemplo 2 (blindaje del epítipo).

Ejemplo 10

Ensayo CDC en células CD38-positivas por mutantes del anticuerpo 005 de CD38

Se preincubaron 0.1×10^6 células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL) en un volumen total de 100 μ L durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 μ L de suero humano normal como fuente de C1q (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μ L de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La capacidad potenciadora de CDC de la mutación E435R, que demostró potenciar la actividad CDC de los anticuerpos 7D8 y 005 en células Daudi y Raji, se analizó además en células Wien133 con diferentes concentraciones de suero humano normal (NHS). Se preincubaron 0.1×10^6 células Wien133 durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL) en un volumen total de 50 μ L. A continuación, se añadió NHS como fuente de C1q para alcanzar una concentración final de 20% o 50% de NHS en un volumen total de 100 μ L. La mezcla de reacción se incubó en un incubador a 37 °C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μ L de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

Se descubrió que las mutaciones identificadas en la región CH2-CH3 que provocaron la pérdida o el aumento de la actividad CDC para el anticuerpo CD20 7D8, tenían el mismo efecto en el anticuerpo 005 que reconoce CD38. La Figura 9 muestra que 005-I253D, H443A, K439E y S440K mostraron una pérdida completa de actividad CDC tanto en células Daudi (Figura 9A) como Raji (Figura 9B), mientras que el mutante 005-E345R mostró una actividad CDC fuertemente aumentada en ambas líneas celulares. De forma comparable a los datos de 7D8, la combinación de 005-K439E + 005-S440K, que provocan la pérdida de CDC como mutante simple, dio lugar a la restauración de la CDC. Sorprendentemente, 005-E435R incluso indujo fuertemente la CDC en células Wien133, para las que el tipo silvestre

005 no es capaz de inducir la muerte por CDC (Figura 9C). La muerte por CDC de 005-E345R en células Wien133 se observó tanto con concentraciones de suero del 20% como del 50% (Figura 9C). También en células Raji, tanto 7D8-E345R como 005-E345R mostraron una mayor CDC *in vitro* en suero al 50%, con una eficacia similar a la del suero al 20% (Figura 9D).

- 5 Como la mutación E345R en la región CH2-CH3 dio lugar a una actividad CDC mejorada tanto en el anticuerpo CD20 7D8 como en el anticuerpo CD38 005 ensayados, la mutación E345R se considera una modificación general de anticuerpos que puede aplicarse para inducir o mejorar la CDC.

Ejemplo 11

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

Al mutar posiciones de aminoácidos en el parche hidrófobo de la interfaz Fc:Fc de la IgG, se encontró que la eficacia de la CDC se veía alterada o aumentada. Se siguió explorando la implicación de las interacciones en la interfaz Fc-Fc, y por tanto posiblemente la formación de una estructura oligomérica (por ejemplo, anillo hexamérico) como se observa en la estructura cristalina de b12, en la eficacia CDC. Por lo tanto, se utilizó un péptido de 13 residuos (DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:7)) que se dirige a un sitio de unión consenso en la región del parche hidrófobo en la superficie de la IgG Fc de tipo silvestre (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83). De hecho, la identificación del sitio de unión consensuado en la superficie de IgG Fc como una región adaptativa que está preparada para la interacción con una variedad de moléculas distintas (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83), es coherente con la identificación de los aminoácidos centrales en el parche hidrófobo que participan en la interacción Fc-Fc en la estructura cristalina de IgG1 b12 (Saphire et al., Science 2001 Aug 10;293(5532):1155-9). Las interacciones que están presentes en todas las interfaces de unión están mediadas por un conjunto compartido de seis aminoácidos (Met-252, Ile-253, Ser-254, Asn-434, His-435, y Tyr-436), así como por contactos vertebrales compartidos (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83). Por consiguiente, se espera que el péptido de unión a Fc afecte a la interacción Fc-Fc y, en consecuencia, a la eficacia CDC.

- 25 Se preincubaron 0.1×10^6 células Daudi en 75 μ L con 1.0 μ g/mL de anticuerpo no purificado en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador. Se añadieron 25 μ L de una serie de concentraciones (rango 0.06-60 μ g/mL de concentración final) del péptido de unión a Fc DCAWHLGELVWCT a las células opsonizadas y se incubaron durante 10 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μ L de NHS como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 25 μ L de medio RPMI helado, suplementado con 0.1% de BSA. Se añadieron 15 μ L de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante análisis FACS.

Se encontró que la CDC mediada por el tipo silvestre 005 (Figura 10A) o 7D8 (Figura 10B) era inhibida por el péptido de unión a Fc DCAWHLGELVWCT de forma dependiente de la dosis. Estos datos de competición sugieren de nuevo la implicación de las interacciones Fc-Fc en el parche hidrófobo de la IgG en la eficacia de la CDC. Los mutantes IgG1-005-E345R e IgG1-7D8-E345R con CDC mejorada fueron ambos menos sensibles a la competencia por el péptido de unión a Fc en comparación con sus correspondientes anticuerpos de tipo silvestre, lo que sugiere que la mutación E345R da lugar a una mayor estabilidad de la interacción Fc-Fc y, en consecuencia, a una mayor CDC.

Ejemplo 12

- 40 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CD38 por variantes del anticuerpo CD38 HuMAb 005

Se cosecharon células Daudi (5×10^6 células/ml), se lavaron (dos veces en PBS, 1200 rpm, 5 min) y se recogieron en 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero cósmico de ternera (CCS) (HyClone, Logan, UT, EE.UU.), al que se añadieron 200 μ Ci⁵¹Cr (Cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos). La mezcla se incubó en un baño de agua con agitación durante 1 hora a 37°C. Tras lavar las células (dos veces en PBS, 1200 rpm, 5 min), se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de CCS, se contaron por exclusión de azul tripán y se diluyeron a una concentración de 1×10^5 células/mL.

Mientras tanto, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas frescas (Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) utilizando centrifugación de densidad Ficoll estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio de separación de linfocitos; Lonza, Verviers, Francia). Tras la resuspensión de las células en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de CCS, las células se contaron por exclusión de azul tripán y se concentraron a 1×10^7 células/mL.

Para el experimento ADCC, 50 μ L de células Daudi marcadas con ⁵¹Cr (5.000 células) se preincubaron con 15 μ g/mL de anticuerpo CD38 IgG1-005 o IgG1-005-E345R mutante en un volumen total de 100 μ L de medio RPMI suplementado con 10% CCS en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50 μ L de PBMC (500.000 células), lo que dio lugar a una relación de efector a diana de 100:1. La cantidad máxima de lisis celular se determinó a partir de la muestra. La cantidad máxima de lisis celular se determinó incubando 50 μ L de células Daudi marcadas con ⁵¹Cr (5.000 células) con 100 μ L de Triton-X100 al 5%. La

cantidad de lisis espontánea se determinó incubando 5.000 células Daudi marcadas con ^{51}Cr en 150 μL de medio, sin ningún anticuerpo ni células efectoras. El nivel de lisis celular independiente del anticuerpo se determinó incubando 5,000 células Daudi con 500,000 PBMC sin anticuerpo. Posteriormente, las células se incubaron 4 h a 37°C , 5% de CO_2 . Para determinar la cantidad de lisis celular, se centrifugaron las células (1200 rpm, 3 min) y se transfirieron 75 μL de sobrenadante a tubos micrónicos, tras lo cual se contó el ^{51}Cr liberado utilizando un contador gamma. Los recuentos por minuto (cpm) medidos se utilizaron para calcular el porcentaje de lisis mediada por anticuerpos de la siguiente manera:

$$(\text{cpm muestra} - \text{cpm lisis independiente de Ab}) / (\text{cpm máx. lisis} - \text{cpm lisis espontánea}) \times 100\%$$

La Tabla 15 muestra los valores EC_{50} calculados de IgG1-005-wt e IgG1-005-E345R en el ensayo ADCC realizado. Se ensayaron cuatro muestras. IgG1-005-E345R muestra un valor EC_{50} significativamente menor que IgG1-005-wt de las cuatro muestras ensayadas.

Tabla 15 Valores EC_{50} calculados de los cuatro experimentos realizados.

ADCC		IgG1-005-wt	IgG1-005-E345R	
		EC_{50}	EC_{50}	
A		5.7	1.2	
B		8.3	4.0	
C		14.1	4.1	
D		5.0	0.6	
	promedio	8.3	2.5	ng/ml
	SEM	4.1	1.9	
TTEST	2-cola	P =	0.04	
Factor mejorado			3.3	tiempos

La Figura 11 muestra que en comparación con el anticuerpo HuMab-005 de tipo silvestre, el IgG1-005-E345R mutante demostró una mayor eficacia de la capacidad ADCC, siendo capaz de inducir ADCC a concentraciones más bajas.

Ejemplo 13

Análisis farmacocinético y de unión a FcRn de mutantes 7D8 comparados con 7D8 de tipo silvestre

El receptor Fc neonatal (FcRn) es responsable de la larga semivida plasmática de la IgG al protegerla de la degradación. Tras la internalización del anticuerpo, el FcRn se une a las regiones Fc del anticuerpo en los endosomas, donde la interacción es estable en el entorno ligeramente ácido (pH 6.0). Al reciclarse a la membrana plasmática, donde el entorno es neutro (pH 7.4), la interacción se pierde y el anticuerpo se libera de nuevo a la circulación. Esto influye en la semivida plasmática de la IgG.

La capacidad de la IgG1-7D8-E354R mutante para interactuar con FcRn de ratón, mono cynomolgus y humano se probó en un ELISA. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se cubrieron placas de 96 pocillos con 5 $\mu\text{g/mL}$ (100 $\mu\text{L/pocillo}$) de dominio extracelular biotinilado recombinantemente producido de FcRn (ratón, humano o cynomolgus) (FcRnECDHis-B2M-BIO), diluido en PBST más 0.2% de BSA; 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces con PBST, y se añadió IgG1-7D8 o IgG1-7D8-E354R de tipo silvestre diluida 3 veces en serie (en PBST/0.2% BSA, pH 6.0), y las placas se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBST/0.2% BSA, pH 6.0. Se añadió IgG(Fab'2)-HRP antihumana de cabra (Jackson Immuno Research, cat no: 109-035-097) diluida en PBST/0.2% BSA, pH 6.0, y se incubaron las placas durante 1 hora. Tras el lavado, se añadió ABTS como sustrato y las placas se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se leyó a 405, utilizando un lector ELISA EL808.

Los ratones de este estudio se alojaron en una unidad de barrera de la Instalación Central de Animales de Laboratorio (Utrecht, Países Bajos) y se mantuvieron en jaulas con tapa de filtro con agua y comida suministradas ad libitum. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht.

Para analizar la farmacocinética de los mutantes 7D8 *in vivo*, se inyectó por vía intravenosa a ratones SCID (C.B-17/lcrCrI-scid-BR, Charles-River) 100 μg (5 mg/kg) de 7D8 de tipo silvestre, IgG1-7D8-E354R, -S440K o K322A; 3 ratones por grupo.

Se tomaron muestras de sangre de 50 µL de la vena safena a los 10 minutos, 4 horas, 24 horas, 2 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la administración del anticuerpo. La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 g. El plasma se almacenó a - 20°C hasta la determinación de las concentraciones de mAb.

Las concentraciones de IgG humana se determinaron mediante un ELISA tipo sándwich. Como anticuerpo de captura se utilizó un mAb de ratón anti-IgG-kappa humana clon MH16 (#M1268, CLB Sanguin, Países Bajos), recubierto en placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL. Tras bloquear las placas con PBS suplementado con un 2% de suero de pollo, se añadieron las muestras, se diluyeron en serie en tampón ELISA (PBS suplementado con un 0.05% de Tween 20 y un 2% de suero de pollo) y se incubaron en un agitador de placas durante 1 h a temperatura ambiente (TA). A continuación, se incubaron las placas con inmunoglobulina IgG antihumana de cabra (No. 109-035-098, Jackson, West Grace, PA) y se revelaron con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

Se eligieron ratones SCID porque tienen concentraciones plasmáticas bajas de IgG y, por tanto, una depuración relativamente lenta de IgG. Esto proporciona un modelo PK que es muy sensible para detectar cambios en el aclaramiento debido a la disminución de la unión de la parte Fc γ al receptor Fc neonatal (FcRn).

Las pruebas estadísticas se realizaron con GraphPad PRISM versión 4 (Graphpad Software).

La Figura 12 muestra que tanto HuMab-7D8 salvaje como IgG1-7D8-E345R se unieron bien a FcRn de ratón, humano y de cynomolgus. La unión de IgG1-7D8-E345R fue ligeramente mejor que la del 7D8 de tipo silvestre.

La Figura 13 muestra las concentraciones plasmáticas en el tiempo. No hubo diferencias en el cambio de las concentraciones plasmáticas (aclaramiento) en el tiempo de HuMab-7D8 de tipo silvestre frente a cualquiera de IgG1-7D8-E345R, -S440K o K322A.

Ejemplo 14

Uso de la mutación estabilizadora Fc-Fc E345R para aumentar la actividad bactericida de los anticuerpos IgG contra bacterias que expresan proteínas de superficie de unión a Fc.

El sistema de cascada del complemento es un importante mecanismo de defensa del huésped frente a patógenos y puede dividirse en tres vías de activación diferentes para reconocer patógenos: i) la vía clásica mediada por anticuerpos, que se activa al unirse C1q al anticuerpo unido al patógeno, ii) la lectina y iii) la vía alternativa, en el que el sistema del complemento reconoce directamente y es activado por el patógeno en ausencia de anticuerpos. Las tres vías convergen en el paso de la escisión de C3 y la deposición de C3b. Los microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos de evasión del complemento, uno de los cuales está mediado por Proteína A (Joiner Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:201-30; Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dic;3(12):948-58). La Proteína A se identificó por primera vez en la pared celular de *Staphylococcus aureus* y es bien conocida por su unión a la región Fc de la IgG (Deisenhofer et al., Biochem (1981) 20, 2361-70; Uhlen et al., J. Biol. Chem (1984) 259,1695-1702). Hasta ahora, el efecto antifagocitario de la Proteína A y su papel en la patogénesis de *S. aureus* se explicaba por la interacción entre la Proteína A y la IgG, que da lugar a una orientación incorrecta del anticuerpo para ser reconocido por el receptor Fc de los neutrófilos (Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dic;3(12):948-58).

El Ejemplo 11 muestra que la CDC mediada por anticuerpos IgG1 específicos de células B fue inhibida por el péptido competidor de unión a Fc DCAWHLGELVWCT. El péptido se dirige al sitio de unión consenso en IgG Fc que coincide con el sitio de unión para Proteína A, Proteína G y factor reumatoide (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456): 1279-83). Basándose en estos datos, se cree que el mecanismo de evasión del complemento bacteriano mediado por la Proteína A podría funcionar compitiendo por la unión a Fc, lo que daría lugar a la desestabilización de la interacción Fc-Fc de un anticuerpo específico de microbios y, en consecuencia, a la inhibición de la activación del complemento mediada por anticuerpos. Además, el Ejemplo 11 también muestra que los anticuerpos IgG1 específicos de células B que contienen la mutación E345R potenciadora de CDC eran menos sensibles a la inhibición de CDC por el péptido competidor de unión a Fc DCAWHLGELVWCT que los anticuerpos de tipo silvestre progenitores. Extrapolando estos resultados a las proteínas de unión a Fc expresadas en microbios, la mayor estabilización de las interacciones Fc-Fc de IgG1 por la mutación E345R haría que los anticuerpos específicos de microbios fueran menos propensos a la inhibición del complemento por una estrategia de escape del patógeno a través de la competencia de unión a Fc por proteínas de superficie microbianas, como la Proteína A. En consecuencia, la introducción de la mutación E345R en anticuerpos IgG dirigidos contra una bacteria daría lugar a una mayor deposición de C3b en bacterias y una mayor actividad bactericida en comparación con los anticuerpos de tipo silvestre progenitores.

Como medida *in vitro* para la eliminación bacteriana mediada por complemento, puede determinarse tanto la fagocitosis por neutrófilos como la generación de C3a en el plasma, que coincide con la deposición de C3b sobre las bacterias, como se describe a continuación. De hecho, se ha descrito que la deposición de C3b en *S. aureus* provoca una fagocitosis mejorada y se correlaciona con la eliminación bacteriana (Rooijakkers et. al., Nature Immunology 2005: 6,920-927).

S. aureus se marcará con FITC incubando un cultivo bacteriano de crecimiento exponencial con 100 µg/mL de FITC durante 1h a 37°C en tampón carbonato 0.1 M (pH 9.6). Las células nucleares polimorfas (PMN) humanas se aislarán utilizando un gradiente de Ficoll. Las bacterias marcadas con FITC se opsonizarán con una serie de concentraciones de anticuerpos específicos con o sin la mutación E345R. La fagocitosis se realizará *in vitro* incubando 1×10⁸ bacterias opsonizadas marcadas con FITC con PMN humanos en presencia de un 25% de suero empobrecido en IgG como fuente de complemento durante 25 min a 37°C en un volumen total de 200 µL bajo agitación vigorosa. Las células se fijarán y los eritrocitos se lisarán mediante incubación con solución lisante BD FACS durante 15 min a temperatura ambiente. Tras el lavado, se medirá la fagocitosis mediante FACS. La población de neutrófilos se seleccionará por medio de la dispersión frontal y lateral y la fagocitosis se expresará como la fluorescencia media en la población de neutrófilos. Alternativamente, se medirá la generación de C3a en las muestras mediante ELISA como medida de la activación del complemento y la deposición de C3b.

Se espera que los anticuerpos *específicos de S. aureus* que contienen la mutación E345R induzcan más activación del complemento y fagocitosis por neutrófilos que los anticuerpos de tipo silvestre progenitores. Un ejemplo de anticuerpo que podría utilizarse en tales experimentos es el pagibaximab IgG1 monoclonal quimérico (BSYX-A110; Biosynexus), dirigido contra el ácido lipoteicoico (LTA) que está embebido en la pared celular de los estafilococos (Baker, Nat Biotechnol. 2006 Dic;24(12): 1491-3; Weisman et al., Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44).

Ejemplo 15

Uso de mutaciones inhibitoras de CDC que restringen la activación de CDC a células diana unidas simultáneamente por una mezcla de dos anticuerpos monoclonales terapéuticos diferentes.

Como se describe en el Ejemplo 6, las mutaciones K439E y S440K del anticuerpo CD20 7D8 disminuyeron la eficacia CDC como anticuerpos monoclonales. La mezcla de anticuerpos 7D8 que contenían estas mutaciones restauró la CDC. Así pues, la CDC eficaz se restringió a las células unidas por ambos anticuerpos mutantes simultáneamente. Como se describe en el Ejemplo 10, las mutaciones K439E y S440K del anticuerpo 005 CD38 disminuyeron la eficacia de CDC como anticuerpos monoclonales. La mezcla de anticuerpos 005 que contenían estas mutaciones restauró la CDC. Así pues, la CDC eficaz se restringió a las células unidas por ambos anticuerpos mutantes simultáneamente.

Puede ser ventajoso restringir la inducción de CDC eficiente a células diana que expresan dos antígenos específicos simultáneamente, explotando su expresión combinada para mejorar la selectividad de la inducción de CDC. Para restringir la inducción de CDC a las células unidas por los anticuerpos CD20 y CD38 simultáneamente, el par de 7D8-K439E y 005-S440K o el par de 7D8-S440K y 005-K439E se añadirán por separado o se mezclarán 1:1 en experimentos de CDC como sigue. Se preincubarán 0.1 × 10⁶ células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados o mezcla de anticuerpos (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadirán 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubará en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detendrá poniendo las placas en hielo. Se añadirán 10 µL de yoduro de propidio y se determinará la lisis celular mediante FACS. Se espera que 7D8-K439E, 005-S440K, 7D8-S440K y 005-K439E muestren una eficacia CDC limitada. Se espera que la adición simultánea de 7D8-K439E y 005-S440K restablezca la eficacia CDC específicamente en células que expresen tanto CD20 como CD38. Del mismo modo, se espera que la mezcla de 7D8-S440K y 005-K439E restaure la CDC eficiente específicamente en células que expresen tanto CD20 como CD38.

Ejemplo 16

Aumento de la especificidad de la CDC mejorada mediante la combinación de E345R con mutaciones inhibitoras complementarias K439E y S440K en una mezcla de dos anticuerpos monoclonales diferentes

Como se describe en el Ejemplo 6, las mutaciones K439E y S440K del anticuerpo CD20 7D8 disminuyeron la eficacia CDC como anticuerpos monoclonales. La mezcla de anticuerpos 7D8 que contenían estas mutaciones restauró la CDC. Así pues, la CDC eficaz se restringió a las células unidas por ambos anticuerpos mutantes simultáneamente. Como se describe en el Ejemplo 10, las mutaciones K439E y S440K del anticuerpo 005 CD38 disminuyeron la eficacia de CDC como anticuerpos monoclonales. La mezcla de anticuerpos 005 que contenían estas mutaciones restauró la CDC. Así pues, la CDC eficaz se restringió a las células unidas por ambos anticuerpos mutantes simultáneamente.

Puede ser ventajoso restringir la mejora de la inducción de CDC a células diana que expresan dos antígenos específicos simultáneamente, explotando su expresión combinada para mejorar la selectividad de la inducción de CDC mejorada. También puede ser ventajoso restringir la mejora de la inducción de CDC a células diana que están unidas por mezclas de al menos dos anticuerpos diferentes simultáneamente, dichos anticuerpos uniendo un antígeno de superficie celular idéntico en dos epítomos diferentes simultáneamente, o en dos epítomos de competencia cruzada, similares o idénticos.

Por lo tanto, para restringir la inducción CDC mejorada a células unidas simultáneamente por anticuerpos CD20 y CD38, la mutación potenciadora de CDC E345R se combinó con mutaciones inhibitoras de CDC en los anticuerpos 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K y 005-E345R/K439E. Estos anticuerpos se añadieron por separado o mezclados 1:1 en experimentos CDC de la siguiente manera Se preincubaron 0.1 × 10⁶ células Wien133

(también pueden utilizarse otros tipos celulares como células Daudi o Raji) en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (concentración final 0.056-10.000 ng/mL en diluciones de 3 veces para 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K o 005-E345R/K439E) o mezclas de anticuerpos (concentraciones finales 0.01 µg/mL de anticuerpo CD20 mezclado con 0-333 ng/mL en diluciones triples de anticuerpo CD38; o 3.3 µg/mL de anticuerpo CD38 mezclado con 0.0056-1.000 ng/mL en diluciones triples de anticuerpo CD20) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

Se mezcló una serie de concentraciones del anticuerpo 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K con una concentración fija de 0.01 µg/mL de anticuerpo mutante doble 7D8 (concentración máxima con CDC mínima en células Wien133 como agente único según se determinó a partir de la Figura 14A) para hacer las combinaciones complementarias 005-E345R/K439E + 7D8-E345R/S440K o 005-E345R/S440K + 7D8-E345R/K439E. La Figura 14C muestra que los anticuerpos 005 mutante doble CD38 indujeron CDC de forma dosis-dependiente en presencia de una concentración fija del anticuerpo complementario 7D8-E345R/K439E o 7D8-E345R/S440K CD20, respectivamente. La eficacia CDC de estas combinaciones complementarias (Figura 14C) fue comparable a la del anticuerpo mutante simple (potenciador) 005-E345R como agente único (Figura 14B). Por el contrario, en presencia del anticuerpo irrelevante b12, tanto 005-E345R/K439E como 005-E345R/S440K apenas mostraron CDC en las series de concentraciones ensayadas (comparable a 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K como agentes únicos mostrados en la Figura 14B).

Se mezcló una serie de concentraciones de anticuerpo 7D8-E345R/K439E o 7D8-E345R/S440K con una concentración fija de 33 µg/mL de anticuerpo 005 mutante doble (que muestra una CDC pequeña pero limitada en células Wien133 como agente único según se determina a partir de la Figura 14B) para hacer las combinaciones complementarias 7D8-E345R/K439E + 005-E345R/S440K o 7D8-E345R/S440K + 005-E345R/K439E. La Figura 14D muestra que los anticuerpos 7D8 mutante doble CD20 indujeron CDC muy eficientemente en presencia del anticuerpo complementario 005-E345R/K439E o 005-E345R/S440K CD38 respectivamente, incluso a las concentraciones más bajas ensayadas, asemejándose a no más de unas pocas moléculas de anticuerpo 7D8 mutante doble por célula. Para eliminar la contribución del aumento de la densidad de la cola Fc en la membrana celular a la CDC mejorada observada por la mezcla de anticuerpos 7D8 y 005 con mutaciones complementarias K439E y S440K, también se probaron combinaciones de anticuerpos con mutaciones no complementarias. La Figura 14D muestra que las combinaciones no complementarias mostraron una eficacia CDC mucho menor que las combinaciones complementarias, como resultado de una interacción Fc-Fc menos eficiente que las combinaciones complementarias.

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

Como puede observarse en la Figura 14A y 14B, 7D8-E345R/K439E, 005-E345R/S440K, 7D8-E345R/S440K y 005-E345R/K439E mostraron una eficiencia CDC limitada en comparación con 7D8-E345R solo. Además, se observa que la mezcla de 7D8-E345R/K439E y 7D8-E345R/S440K permitió la CDC con mayor eficacia en comparación con el anticuerpo 7D8 de tipo silvestre como agente único. Del mismo modo, se observó que la mezcla de 005-E345R/K439E y 005-E345R/S440K permitía la CDC con mayor eficacia en comparación con el anticuerpo 005 de tipo silvestre como agente único (datos no mostrados).

Ejemplo 17

Uso de mutaciones inhibitoras de CDC que restringen la activación eficiente de CDC a complejos de anticuerpos formados exclusivamente por anticuerpos administrados terapéuticamente.

Como se describe en el Ejemplo 6, el anticuerpo CD20 7D8 mutante doble K439E/S440K restauró la eficiencia CDC disminuida por mutantes de punto único K439E o S440K. Como se describe en el Ejemplo 10, el anticuerpo CD38 005 mutante doble K439E/S440K restauró la eficacia CDC inhibida por los mutantes de punto único K439E o S440K. Como se ha observado, las mutaciones de punto único interrumpen la interacción Fc:Fc con el aminoácido no mutado en el lado opuesto de la interfaz Fc:Fc. La introducción de la mutación compensatoria en el lado opuesto de la interfaz Fc:Fc restauró la eficacia de la CDC. Así pues, la CDC eficiente estaba aparentemente restringida a complejos de anticuerpos constituidos exclusivamente por anticuerpos que contenían ambas mutaciones.

En otro ejemplo, la inducción de CDC se restringe a complejos de anticuerpos exclusivamente formados por anticuerpos administrados terapéuticamente. Para restringir la inducción de CDC a células unidas por anticuerpos CD20 terapéuticamente o por anticuerpos CD38 exclusivamente, las mutaciones inhibitoras de CDC K439E y S440K se combinarán en los anticuerpos 7D8-K439E/S440K o 005-K439E/S440K. Estos anticuerpos se añadirán por separado en experimentos CDC en ausencia o presencia de IgG no específica de la siguiente manera. Se preincubarán 0.1×10^6 células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados o mezcla de anticuerpos (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadirán 25 µL de suero humano normal como

fuelle de complemento (20% de concentraci3n final) y se incubará en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacci3n se detendrá poniendo las placas en hielo. Se ańadirán 10 µL de yoduro de propidio y se determinará la lisis celular mediante FACS.

- 5 Se espera que 7D8-K439E/S440K induzca CDC con eficiencia similar al anticuerpo 7D8 de tipo silvestre. Se espera que la adici3n de IgG no especílica a 7D8-K439E/S440K no afecte a la eficiencia de inducci3n de CDC para este anticuerpo. Del mismo modo, se espera que 005-K439E/S440K permita la CDC con una eficiencia similar al HuMAb 005 de tipo silvestre. Se espera que la adici3n de IgG no especílica a 005-K439E/S440K no afecte a la eficacia de la inducci3n de CDC para este anticuerpo.

Ejemplo 18

- 10 Uso de mutaciones inhibitoras de CDC que restringen la activaci3n mejorada de CDC a complejos de anticuerpos formados exclusivamente por anticuerpos administrados terapéuticamente.

Como se describe en el Ejemplo 6, el anticuerpo CD20 7D8 mutante doble K439E/S440K restaur3 la eficiencia CDC disminuida por mutantes de punto único K439E o S440K. Como se describe en el Ejemplo 10, el anticuerpo CD38 HuMAb 005 mutante doble K439E/S440K restaur3 la eficacia CDC inhibida por los mutantes de punto único K439E o S440K. Como se ha observado, las mutaciones de punto único interrumpen la interacci3n Fc:Fc con el aminoácido no mutado en el lado opuesto de la interfaz Fc:Fc. La introducci3n de la mutaci3n compensatoria en el lado opuesto de la interfaz Fc:Fc restaur3 la eficacia de la CDC. Así pues, la CDC eficiente estaba aparentemente restringida a complejos de anticuerpos constituidos exclusivamente por anticuerpos que contenían ambas mutaciones.

- 20 En otro ejemplo, la potenciación de la inducci3n de CDC se restringe a complejos de anticuerpos formados exclusivamente por anticuerpos administrados terapéuticamente. Mediante el cribado y la selecci3n de mutaciones que estimulan la interacci3n Fc:Fc explotada para la estimulaci3n de CDC, se podrían identificar mutaciones que pueden formar complejos de anticuerpos inductores de CDC con anticuerpos séricos no especílicos para el antígeno diana de interés. Para restringir la inducci3n mejorada de CDC a las células unidas por complejos de anticuerpos CD20 o por CD38 exclusivamente, la mutaci3n potenciadora de CDC E345R se combinará con mutaciones inhibitoras de CDC en los anticuerpos 7D8-E345R/K439E/S440K o 005-E345R/K439E/S440K. Estos anticuerpos se ańadirán por separado en los experimentos de CDC en ausencia o presencia de IgG no especílica de la diana, de la siguiente manera. Se preincubarán 0.1×10^6 células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados o mezcla de anticuerpos (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuaci3n, se ańadirán 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentraci3n final) y se incubará en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacci3n se detendrá poniendo las placas en hielo. Se ańadirán 10 µL de yoduro de propidio y se determinará la lisis celular mediante FACS.

- 35 Se espera que 7D8-E345R/K439E/S440K induzca CDC con mayor eficiencia en comparaci3n con HuMAb 7D8 de tipo silvestre. Se espera que la adici3n de IgG no especílica a 7D8-E345R/K439E/S440K no afecte a la eficacia de la inducci3n de CDC en comparaci3n con el anticuerpo 7D8 de tipo silvestre. Del mismo modo, se espera que el 005-E345R/K439E/S440K permita la CDC con mayor eficiencia en comparaci3n con el anticuerpo 005 de tipo silvestre. Se espera que la adici3n de IgG no especílica al anticuerpo 005-E345R/K439E/S440K no afecte a la eficacia de la inducci3n de la CDC en comparaci3n con el anticuerpo 005 de tipo silvestre.

Ejemplo 19

- 40 Uso de un enfoque de cribado de mutantes para identificar mutaciones que estimulan la oligomerizaci3n de anticuerpos mediada por la interacci3n Fc:Fc detectada mediante un ensayo CDC.

Como se describe en los Ejemplos 6 y 10, se identificaron mutaciones de aminoácidos que estimulaban la CDC para anticuerpos que reconocían dos antígenos diana diferentes, CD20 y CD38, en múltiples líneas celulares que expresaban niveles variables de dichos antígenos. Sorprendentemente, la mutaci3n puntual única E345R result3 ser suficiente para dotar de lisis celular dependiente de CDC de células Wien133 al anticuerpo anti-CD38 005, que no consigui3 lisar estas células por CDC en formato IgG1 de tipo silvestre.

Otras mutaciones sobre o en la periferia de la interfaz Fc:Fc podrían estimular la oligomerizaci3n y CDC de manera análoga. Alternativamente, las mutaciones podrían estimular indirectamente la oligomerizaci3n, por ejemplo induciendo alostéricamente interacciones Fc:Fc.

- 50 Para determinar si otras mutaciones de aminoácidos podrían estimular la oligomerizaci3n de anticuerpos mediada por Fc, se crib3 una biblioteca de mutantes IgG1-005 anti-CD38 mediante ensayos CDC, tanto individualmente como mezclados por pares para seleccionar, por ejemplo, pares de aminoácidos que interaccionan a través de la interfaz Fc:Fc. Sin embargo, la misma estrategia puede aplicarse a otros anticuerpos, como otro IgG1 o un anticuerpo IgG3.

- 55 Se gener3 una biblioteca focalizada de mutaciones en las posiciones indicadas en la Tabla 16. Las mutaciones se introdujeron en la regi3n Fc de IgG1-005 utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, EE.UU.). En resumen, para cada posici3n de mutaci3n deseada, se utilizaron un cebador directo y un cebador inverso

que codificaban un codón degenerado en la ubicación deseada para replicar una plantilla de ADN plasmídico de longitud completa de la cadena pesada 005 con alotipo IgG1m(f). Las mezclas de ADN resultantes se digirieron con DpnI para eliminar el ADN plasmídico de origen y se utilizaron para transformar *E. coli*. Las colonias resultantes se agruparon y cultivaron y el ADN plasmídico se aisló de estas agrupaciones y se volvió a transformar en *E. coli* para obtener colonias clonales. El ADN plasmídico mutante aislado de las colonias resultantes se comprobó mediante secuenciación del ADN (LGC genomics, Berlín, Alemania). Los casetes de expresión se amplificaron a partir del ADN plasmídico mediante PCR y las mezclas de ADN que contenían tanto una cadena pesada mutante como una cadena ligera de tipo silvestre de IgG1-005 se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectin (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente según lo descrito por el fabricante. Se recogieron los sobrenadantes de las células transfectadas que contenían anticuerpos mutantes. Los sobrenadantes de anticuerpos mutantes se analizaron en ensayos CDC tanto individualmente como en mezclas por pares de la siguiente manera.

0.1×10^6 células Daudi o Wien-133 (se pueden usar otros tipos de células tal como las células Raji) se preincubaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 1.0 ug/ml de anticuerpos no purificados en un volumen total de 100 μ L durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 30 μ L de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 30%) y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μ L de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

Las mutaciones descritas en la Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18 se seleccionaron por su capacidad de mejorar la oligomerización detectada por la eficacia CDC, ya sea como mutante simple o cuando se mezclan con otros mutantes, por ejemplo, enfrentando la mutación a través de la interfaz Fc:Fc. Opcionalmente, las mutaciones pueden examinarse más a fondo por su capacidad de no comprometer la unión a FcRn, Proteína-A o Proteína-G, ADCC, ADCP u otras funciones efectoras mediadas por el dominio Fc. La combinación de tales mutaciones puntuales estimulantes en un dominio Fc puede estimular aún más la oligomerización y la eficacia CDC.

Se probaron mutaciones en la región CH2-CH3 incorporadas en el anticuerpo CD38 005 para determinar su capacidad de inhibir la oligomerización determinada por CDC en células Daudi. La lisis del anticuerpo mutante se comparó con el tipo silvestre 005, para el que la lisis se fijó en el 100%. El punto de corte para la inhibición se fijó en $\leq 66\%$ de lisis. Medido de esta manera, la mayoría de las mutaciones probadas inhibieron CDC (véase la Tabla 16).

Se probaron mutaciones en la región CH2-CH3 incorporadas en el anticuerpo CD38 005 para determinar su capacidad de aumentar la oligomerización determinada por CDC en células Wien133 (Tabla 17). El anticuerpo CD38 005 de tipo silvestre no es capaz de inducir CDC en células Wien133. Los mutantes que mostraron $\geq 39\%$ de lisis celular se calificaron como potenciadores. De forma totalmente inesperada, prácticamente todas las sustituciones obtenidas de los aminoácidos E345 y E430 estimularon la lisis celular por CDC. Para verificar este resultado, se sustituyeron los aminoácidos E345, E430 y S440 con cada posible mutación mediante mutagénesis dirigida al sitio y se comprobó su capacidad para mejorar la oligomerización determinada por CDC de células Wien133 utilizando un nuevo lote de suero humano, produciendo una lisis ligeramente más eficiente (Tabla 18). De nuevo, todas las sustituciones de E345 y E430 indujeron una CDC eficiente de las células Wien133.

Las siguientes mutaciones preferidas causaron $\geq 39\%$ de lisis celular de cP247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y y S440W.

Tabla 16. Porcentaje de lisis de células dadas en presencia de 1.0 μ g/ml de mutaciones puntuales del anticuerpo IgG1-2B5. El IgG1-2B5 de tipo silvestre lisó el 86% de las células en estas condiciones. Para cada una de las posiciones individuales que han sido sustituidas por cito amínico se dan en la columna exterior izquierda. El amínico sustituido para cada posición concreta se indica seguido del porcentaje de lisis medido en paréntesis () en las filas horizontales de las posiciones individuales.

[illegible]

"donde "gel" significa que hubo una deflexión del residuo de aminoácido en la posición indicada.

Tabla 17. Porcentaje de lista de células When-133 en presencia de 1.0 µg/ml de indantes puntuales del anticuerpo IgG1-005. El IgG1-005 de tipo silvestre lisó el 3% de las células en estas condiciones. Para cada una de las posiciones individuales que han sido sustituidas por otro aminoácido se dan en la columna exterior izquierda. El aminoácido sustituido para cada posición concreta se da según el porcentaje de lista medido indicado en paréntesis () en las filas horizontales de las posiciones individuales.

Posición	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)	
P347	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)	
I353	A (11)	D (9)	K (3)	M (3)	N (3)	R (4)	S (3)	V (51)									
S254	E (14)	F (10)	G (32)	H (2)	I (15)	K (12)	L (85)	P (2)	T (9)	W (8)							
H310	K (3)	W (13)															
Q311	A (8)	C (4)	E (3)	F (19)	G (4)	H (6)	I (26)	K (18)	L (55)	N (6)	P (12)	R (18)	S (9)	T (3)	W (41)	Y (12)	
E345	A (57)	C (22)	F (48)	G (47)	H (49)	I (59)	K (42)	L (72)	M (67)	P (51)	R (64)	S (60)	T (53)	V (67)	W (52)	Y (70)	
D/E356	G (39)	I (31)	L (30)	R (54)	T (32)	V (13)											
T359	G (2)	N (3)	P (4)	R (40)													
E382	F (2)	K (2)	L (44)	M (21)	P (3)	V (53)	W (2)										
G385	D (5)	H (4)	N (18)	Q (4)	R (14)	S (4)	T (4)										
Q386	A (5)	C (4)	D (4)	E (4)	F (3)	G (3)	H (3)	I (4)	K (50)	L (3)	N (4)	P (2)	R (4)	S (5)	T (3)	V (3)	W (3)
E430	A (54)	F (68)	G (55)	H (57)	L (56)	P (56)	Q (31)	R (39)	S (20)	V (53)							Y (4)
N434	D (2)	E (2)	K (2)	R (2)	S (3)	W (16)											
Y436	I (49)	K (3)	L (4)	R (3)	S (3)	T (2)	W (3)										
Q438	E (3)	K (3)	S (2)	T (2)	W (2)	Y (2)											
K439	A (3)	D (2)	H (2)	L (2)	P (2)	T (2)	Y (4)										
S440	A (3)	C (3)	D (6)	E (2)	F (2)	G (3)	I (2)	N (2)	R (2)	T (3)	Y (54)						

Tabla 16 Porcentaje de lisas de células Wien-133 en presencia de 1.0 pg/ml de mutantes puntuales del antígeno IgG1-005. El IgG1-005 tipo silvestre lisó el 12% de las células en estas condiciones. Cada una de las posiciones individuales que han sido sustituidas por otro aminoácido se indican en la columna exterior izquierda. El aminoácido sustituido para cada posición concreta se indica según el porcentaje de lisas medido indicado en paréntesis () en las filas horizontales de las posiciones individuales.

Posición	A (04)	C (87)	D (76)	F (95)	G (96)	H (94)	I (93)	K (97)	L (94)	M (96)	N (85)	P (97)	Q (98)	R (94)	S (93)	T (92)	V (96)	W (93)	Y (94)
E345																			
E430	A (95)	C (79)	D (91)	F (96)	G (96)	H (95)	I (96)	K (93)	L (94)	M (76)	N (85)	P (97)	Q (86)	R (92)	S (96)	T (97)	V (96)	W (98)	Y (97)
S440	A (12)	C (8)	D (41)	E (9)	F (7)	G (6)	H (26)	I (7)	K (6)	L (7)	M (8)	N (12)	P (10)	Q (21)	R (9)	T (10)	V (7)	W (66)	Y (90)

Ejemplo 20

Eficacia *in vivo* de IgG1-7D8-E345R en un modelo subcutáneo de xenoinjerto de linfoma de células B

La eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo IgG1-7D8-E345R se evaluó en un modelo subcutáneo con células Raji-luc #2D1. Estas células muestran ~300,000 moléculas CD20 por célula (determinado por análisis QIFIKIT, datos no mostrados) y alta expresión del receptor de defensa del complemento. Las células se cultivaron en RPMI con 10% de suero cósmico de ternera (HyClone, Logan, UT), penicilina y estreptomycin, 1% (v/v) de piruvato sódico y 1 µg/mL de puromicina (P-8833, Sigma, Zwijndrecht). Las células se cosecharon en fase logarítmica (aproximadamente un 70% de confluencia). Se utilizaron ratones SCID hembra de seis a once semanas de edad (C.B-17/lcrPrkdc-scid/CRL) (Charles-River). En el día 0, se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de cada ratón 5×10^6 células Raji-luc #2D1 en 200 µL de PBS. El desarrollo tumoral se controló mediante medición con calibrador. Cuando el volumen tumoral medio fue de 100 mm³ (alrededor del día 7), los ratones se clasificaron en grupos (n=9) y se trataron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de una dosis única de 50 µg de anticuerpo por ratón (2.5 mg/kg). Todas las muestras de anticuerpo se suplementaron con anticuerpo irrelevante b12 para obtener una concentración total de anticuerpo de 0.5 mg/mL. Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 18. Siete días después del tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles séricos de IgG humana y comprobar así la correcta administración de anticuerpos. Los tumores se midieron al menos dos veces por semana utilizando un calibrador (PLEXX) hasta que se alcanzó un volumen tumoral final de 1500 mm³, los tumores mostraron ulceraciones o hasta que se observaron signos clínicos graves.

Tabla 18: Grupos de tratamiento y dosificación.

Grupo	Anticuerpo	Dosis
1. tipo silvestre	IgG1-7D8-WT	50 µg (= 2.5 mg/kg)
2. Mutante potenciador de CDC	IgG1-7D8-E345R	50 µg (= 2.5 mg/kg)
3. Control Ab irrelevante	IgG1-b12	50 µg (= 2.5 mg/kg)

La Figura 15A muestra el crecimiento tumoral medio en el día 22, cuando todos los grupos aún estaban completos. El anticuerpo IgG1-7D8 de tipo silvestre inhibió ligeramente el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo de control negativo IgG1-b12, aunque esto no fue estadísticamente significativo. Sólo IgG1-7D8-E345R inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 (análisis ANOVA unidireccional $p < 0.01$).

La Figura 15B muestra un gráfico de Kaplan-Meier del porcentaje de ratones con tumores de tamaño inferior a 700 mm³. En comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control negativo IgG1-b12, la formación de tumores se retrasó significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo IgG1-7D8-E345R (análisis Mantel-Cox $p < 0.01$), pero no en los ratones tratados con IgG1-7D8 de tipo silvestre.

Estos datos demuestran que la mutación E345R potenció la eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo CD20 7D8.

Ejemplo 21

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

La eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo IgG1-005-E345R se evaluó en un modelo subcutáneo con células Raji-luc #2D1. Estas células muestran ~150,000 moléculas CD38 por célula (determinado por análisis QIFIKIT, datos no mostrados) y alta expresión del receptor de defensa del complemento. El protocolo de inoculación tumoral y medición es básicamente el mismo que el descrito en el Ejemplo 20. En el día 0, se inyectaron s.c. en el flanco derecho de ratones SCID 5×10^6 células Raji-luc #2D1 en 200 µL de PBS. Cuando el volumen tumoral medio fue de 100 mm³ (alrededor del día 7), los ratones se clasificaron en grupos (n=7) y se trataron mediante inyección i.p. de una dosis única de 500 µg de anticuerpo por ratón (25 mg/kg). Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 19. Se midieron los tumores hasta alcanzar un volumen tumoral final de 1500 mm³ o hasta que los tumores presentaron ulceraciones o se observaron signos clínicos graves para evitar molestias mayores.

La Figura 16A muestra el crecimiento tumoral medio en el día 21, cuando todos los grupos aún estaban completos. El anticuerpo IgG1-005 de tipo silvestre inhibió ligeramente el crecimiento tumoral, aunque no fue estadísticamente significativo. Sólo IgG1-005-E345R inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo irrelevante de control en el día 21 (ANOVA unidireccional $p < 0.05$).

La Figura 16B muestra un gráfico de Kaplan-Meier del porcentaje de ratones con tumores de tamaño inferior a 500 mm³. La formación de tumores se retrasó significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo IgG1-005-E345R en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 (análisis de Mantel-Cox $p < 0.001$) o IgG1-005 de tipo silvestre ($p < 0.05$).

Estos datos demuestran que la introducción de la mutación E345R en el anticuerpo CD38 005 dio lugar a una mayor actividad antitumoral *in vivo*.

Tabla 19: Grupos de tratamiento y dosificación.

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

5 Ejemplo 22

La unión monovalente a la diana aumenta aún más la eficacia CDC de los anticuerpos E345R

Una superficie molecular del anillo hexamérico IgG1 observado en la estructura cristalina b12 demuestra que para cada IgG en el anillo hexamérico, uno de los dos sitios de unión C1q está orientado hacia arriba y el otro sitio está orientado hacia abajo de la estructura del anillo, y también un brazo Fab de cada anticuerpo está orientado hacia arriba y uno está orientado hacia abajo, lo que resulta en sólo un brazo Fab por anticuerpo para participar en la unión al antígeno, lo que sugiere la unión monovalente por molécula de anticuerpo en el anillo hexamérico de anticuerpos. La monovalencia podría hacer que los anticuerpos se unieran al antígeno en una orientación compatible con la hexamerización. Para probar esta hipótesis, se ensayó la eficacia CDC de un anticuerpo biespecífico CD38/EGFR con la mutación E345R en células Wien133 CD38 positivas y EGFR negativas, a las que este anticuerpo biespecífico sólo puede unirse monovalentemente a través de CD38, y se comparó con la eficacia CDC del anticuerpo CD38 de unión bivalente, también con la mutación E345R. El anticuerpo monoclonal humano HuMax-EGFR (2F8, descrito en WO 2004/056847) se utilizó como base para los anticuerpos EGFR descritos en este ejemplo.

Los anticuerpos biespecíficos se generaron *in vitro* de acuerdo con la plataforma DuoBody™, es decir, intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA como se describe en WO 2011/147986. La base de este método es el uso de dominios CH3 complementarios, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas. Para permitir la producción de anticuerpos biespecíficos mediante este método, se generaron moléculas IgG1 portadoras de determinadas mutaciones en el dominio CH3: en uno de los anticuerpos IgG1 progenitores la mutación F405L, en el otro anticuerpo IgG1 progenitor la mutación K409R. Para generar anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos progenitores, cada anticuerpo a una concentración final de 0.5 mg/mL, se incubaron con 25 mM de 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) en un volumen total de 100 µL de TE a 37°C durante 90 min. La reacción de reducción se detuvo cuando se eliminó el agente reductor 2-MEA utilizando columnas de centrifugación (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para el ensayo CDC, se preincubaron 0.1×10^6 células Wien133 en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos (0.01 a 10.0 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 17 muestra que, como se esperaba, los anticuerpos CD38 sin la mutación E345R (IgG1-005 de tipo silvestre e IgG-b12-K409R × IgG1-005-F405L) no indujeron la muerte de las células Wien133. Tampoco el anticuerpo EGFR IgG1-2F8-E345R/F405L, que no se unió a las células Wien133 EGFR-negativas (datos no mostrados), indujo la CDC, como era de esperar. La introducción de la mutación K409R no influyó en la capacidad del anticuerpo IgG1-005-E345R para inducir la muerte de ~60% de las células Wien133 (descrita en el Ejemplo 10). Curiosamente, el anticuerpo CD38/EGFR biespecífico IgG1-005-E345R/K409R × IgG1-2F8-E345R/F405L, que sólo puede unirse monovalentemente a las células Wien133 CD38-positivas y EGFR-negativas, mostró un aumento de la muerte máxima por CDC (de ~60% a ~100% de muerte).

Estos datos muestran que la focalización monovalente puede aumentar aún más la capacidad máxima de muerte de los anticuerpos que contienen la mutación E345R potenciadora de CDC. Además, estos datos muestran que la mutación E345R potenciadora de la oligomerización, medida por la potenciación de la actividad CDC, puede aplicarse a otros formatos de anticuerpos, tales como DuoBody.

5 Ejemplo 23

La mutación E345R que potencia la oligomerización puede aplicarse a otros formatos de anticuerpos tales como DuoBody™

Se probó el efecto de la mutación E345R en un anticuerpo biespecífico del formato DuoBody. Se realizaron ensayos CDC con anticuerpos biespecíficos CD20/CD38 en células Wien133 y Raji CD20-positivas y CD38-positivas.

Los anticuerpos biespecíficos se generaron como se describe en el Ejemplo 22. Para el ensayo CDC, se preincubaron 0.1×10^6 células Wien133 o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos (0.01 a 30.0 µg/mL) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 18 muestra que la introducción de la mutación E345R mejoró la CDC del anticuerpo biespecífico IgG1-005-F405L × IgG1-7D8-K409R en células Wien 133 (Figura 18A) y Raji (Figura 18B). Estos datos muestran que la mutación E345R potenciadora de la oligomerización puede aplicarse a otros formatos de anticuerpos para potenciar la actividad de CDC.

Ejemplo 24

E345R rescata la CDC por el anticuerpo EGFR 2F8, que puede potenciarse aún más por la unión a diana monovalente

Como se describe en los Ejemplos 6, 10 y 26, E345R mejoró o rescató la CDC para anticuerpos que reconocen diferentes dianas tumorales hematológicas (CD20 y CD38). Para ampliar el análisis a un antígeno de tumor sólido, se ensayó el efecto de E345R sobre la capacidad de CDC del anticuerpo 2F8 de EGFR en células de carcinoma epidermoide A431. Además, se comprobó el efecto de la orientación monovalente del EGFR sobre la inducción de la CDC mediada por el E345R utilizando un anticuerpo biespecífico EGFRxCD20 (IgG1-2F8-E345R/F405L × IgG1-7D8-E345R/K409R) en células A431 EGFR-positivas y CD20-negativas.

Los anticuerpos biespecíficos se generaron como se describe en el Ejemplo 22. Para el ensayo CDC, se marcaron 5×10^6 células A431/mL con 100 µCi ^{51}Cr durante 1h a 37°C. Las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio a una concentración de 1×10^5 células/mL. Las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio a una concentración de 1×10^5 células/mL. Se incubaron 25,000 células marcadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0-30 µg/mL en diluciones de 3 veces) en un volumen total de 100 µL durante 15 min a TA. A continuación, se añadieron 50 µL de dilución de suero humano normal como fuente de complemento (25% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 1h. Las células se centrifugaron (3 min a 300xg) y se añadieron 25 µL de sobrenadante a 100 µL de microscint en una optiplaca blanca de 96 pocillos (PerkinElmer) para incubar en un agitador (750 rpm) durante 15 min. La liberación de ^{51}Cr se determinó como recuentos por minuto (cpm) en un contador de centelleo. La lisis máxima (100%) se determinó mediante el nivel de ^{51}Cr medido en el sobrenadante de las células tratadas con Triton X-100. La lisis espontánea se determinó mediante el nivel de ^{51}Cr medido en el sobrenadante de las células incubadas sin anticuerpos. La lisis celular específica se calculó según la fórmula Lisis específica = $100 \times (\text{cpm muestra} - \text{cpm espont}) / (\text{cpm máx} - \text{cpm espont})$.

La Figura 19 muestra que IgG1-2F8-E345R/F405L es capaz de lisar células A431 por CDC, mientras que el tipo silvestre 2F8 no es capaz de matar células A431. Estos datos demuestran que la actividad CDC puede rescatarse en el anticuerpo EGFR 2F8 mediante la introducción de la mutación E345R. Esto amplía potencialmente la aplicabilidad de la mutación E345R potenciadora de la CDC a anticuerpos dirigidos contra antígenos de tumores sólidos.

El anticuerpo biespecífico EGFRxCD20 IgG-2F8-E345R/F405L × IgG1-7D8-E345R/K409R, mostró una mayor potenciación de CDC en las células A431 EGFR-positivas, CD20-negativas.

Estos datos apoyan aún más la hipótesis de que la monovalencia facilita la formación de interacciones Fc-Fc y la subsiguiente inducción de CDC como se postula para un anticuerpo de unión a CD38 descrito en el Ejemplo 22.

Ejemplo 25

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

Como se describe en los Ejemplos 6, 10 y 24, E345R mejora o induce la actividad CDC de varios anticuerpos con diferentes especificidades diana (CD20, CD38 y EGFR), como se probó en múltiples líneas celulares que expresaban niveles variables de dichos antígenos. Por lo tanto, se consideró que la introducción de la mutación E345R era un mecanismo general para potenciar o rescatar la CDC de los anticuerpos existentes. Para corroborar esto, se probó el efecto de la mutación E345R sobre la CDC para más anticuerpos con eficacia CDC intrínseca variable en células Daudi y Wien133: El anticuerpo CD38 003, descrito en WO 2006/099875 y los anticuerpos CD20 rituximab (tipo I) y 11B8 (tipo II), descritos en WO 2005/103081. Los anticuerpos CD20 pueden dividirse en dos subgrupos (Beers et al. Seminars in Hematology 47, (2) 2010, 107-114). Los anticuerpos CD20 de tipo I muestran una notable capacidad para activar el complemento y provocar CDC mediante la redistribución de las moléculas CD20 en la membrana plasmática en balsas lipídicas, que agrupan las regiones Fc del anticuerpo y permiten una mejor unión a C1q. Los anticuerpos CD20 de tipo II no modifican de forma apreciable la distribución de CD20 y, sin la agrupación concomitante, son relativamente ineficaces en la CDC.

Se preincubaron 0.1×10^6 células Daudi o Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos no purificados (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 µg/mL) en un volumen

total de 70 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 30 µL de suero humano normal como fuente de C1q (concentración final del 30%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 20 muestra que la mutación E345R mejoró la CDC para todos los anticuerpos ensayados tanto en células (A) Daudi como (B) Wien133. Curiosamente, a las concentraciones usadas todos los anticuerpos que no indujeron CDC en el formato de tipo silvestre, indujeron CDC eficientemente tras la introducción de la mutación E345R: CD38 mAb 003 y CD20 tipo II mAb 11B8 en células Daudi, y CD38 mAbs 005 y 003 y CD20 tipo II mAb 11B8 en células Wien133. Estos datos sugieren que la potenciación de la oligomerización de anticuerpos, más concretamente mediante la introducción de una mutación E345R, es un mecanismo general para potenciar o rescatar la CDC por anticuerpos existentes.

Ejemplo 26

E345R mejora la internalización de los anticuerpos de factor tisular

Para probar si la oligomerización aumentada puede inducir una internalización aumentada del anticuerpo, se realizaron estudios de colocalización de anticuerpos de Factor Tisular (TF) de tipo silvestre y mutados E345R con el marcador lisosomal LAMP1 mediante microscopía confocal.

Las células SK-OV-3 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio (espesor 1.5 micrones, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Alemania) en medio de cultivo tisular estándar a 37°C durante 1 día. Las células se preincubaron durante 1 hora con 50 µg/mL de leupeptina (Sigma) para bloquear la actividad lisosomal, tras lo cual se añadieron 10 µg/mL de anticuerpo contra el factor tisular (TF) (WO 2010/066803). Las células se incubaron durante 1, 3 o 16 horas adicionales a 37°C. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) con formaldehído al 4% (Klinipath). Los portaobjetos se lavaron con tampón de bloqueo (PBS suplementado con 0.1% de saponina [Roche] y 2% de BSA [Roche]) y se incubaron durante 20 minutos con tampón de bloqueo que contenía 20 mM de NH₄Cl para apagar el formaldehído. Los portaobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con un cóctel de CD107a-APC antihumano de ratón (BD Pharmingen) para identificar LAMP1 lisosomal e IgG-FITC antihumano de cabra (Jackson) para identificar anticuerpos TF. Los portaobjetos se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo y se montaron durante la noche en portaobjetos de microscopio utilizando 20 µL de medio de montaje (se disolvieron 6 g de glicerol [Sigma] y 2.4 g de Mowiol 4-88 [Omnilabo] en 6 ml de agua destilada a los que se añadieron 12 ml de Tris 0.2 M [Sigma] pH8.5 y se incubaron durante 10 min a 50-60 °C; el medio de montaje se tomó en licuotas y se almacenó a -20 °C). Se tomaron imágenes de los portaobjetos con un microscopio confocal Leica SPE-II (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63x 1.32-0.6 y software LAS-AF.

Las imágenes TIFF en escala de grises de 12 bits fueron analizadas para colocalización usando el software MetaMorph® (versión Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, USA). Las imágenes se importaron como apilamientos y se sustrajo el fondo. Se utilizaron umbrales idénticos (fijados manualmente) para todas las imágenes FITC y todas las imágenes APC. La colocalización se representó como la intensidad de píxel de FITC en la región de interés (ROI), donde la ROI se compone de todas las regiones APC positivas. Para comparar diferentes portaobjetos teñidos con diferentes anticuerpos TF, las imágenes se normalizaron utilizando la intensidad de píxel de APC. Se utilizó CD107a-APC antihumano de ratón para teñir el marcador lisosomal LAMP1 (CD107a). La intensidad de píxel de LAMP1 no debería diferir entre varios anticuerpos TF visualizados.

Los valores normalizados de colocalización de FITC y APC se expresan en unidades arbitrarias según la fórmula $[(TPI_{FITC} \times \text{porcentaje de colocalización})/100] \times [1/TPI_{APC}]$.

Porcentaje de colocalización = TPI_{FITC} que colocaliza con un píxel APC / TPI_{APC}

TPI, Intensidad total de píxeles

La Figura 21 representa la cantidad de intensidad de píxel FITC de los anticuerpos TF de tipo silvestre y mutado E345R que se superponen con el marcador lisosomal marcado con APC. Para cada anticuerpo o condición probada, se analizaron tres imágenes diferentes de un portaobjetos que contenía ~ 1, 3 o >5 células. Se observó variación entre las diferentes imágenes dentro de cada portaobjetos. Aún así, era evidente que la mutación E345R para los anticuerpos 011 y 098 producía un aumento de la colocalización lisosomal después de 1 hora de incubación, en comparación con los anticuerpos 011 y 098 de tipo silvestre. Estos resultados indican que la mutación E345R induce una internalización y colocalización lisosomal más rápidas y, por tanto, podría potenciar los conjugados anticuerpo-fármaco.

Ejemplo 27

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

Los Ejemplos 25 y 28 muestran que la eficacia CDC del rituximab de tipo silvestre en células Daudi y Wien133 fue mejorada al introducir la mutación E345R. Esta eficacia CDC mejorada es el resultado de la estabilización de las interacciones Fc-Fc mediada por E345R. La estructura anular hexamérica del anticuerpo formada concomitantemente en la membrana de la célula diana puede entonces promover la generación eficiente del complejo de ataque de membrana facilitando la captura y concentración de componentes del complemento activados cerca de la membrana celular. Como resultado de esta activación eficiente del complemento, podrían superarse en parte los efectos inhibidores de las proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana (mCRP). La sobreexpresión de mCRP, como CD55, CD46 y CD59, se considera una barrera para el éxito de la inmunoterapia con anticuerpos antitumorales monoclonales (Jurianz et al., Mol Immunol 1999 36:929-39; Fishelson et al. Mol Immunol 2003 40:109-23, Gorter et al., Immunol Today 1999 20:576-82, Zell et al., Clin Exp Immunol. 2007 Dec 150(3):576-84). Por lo tanto, se comparó la eficacia de rituximab-E345R con la de rituximab de tipo silvestre en una serie de líneas de células B con diferentes niveles de las mCRP CD46, CD55 y CD59, pero niveles comparables de la expresión diana CD20.

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

Para el ensayo CDC, se preincubaron 0.1×10^6 de células en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos de saturación (0.002-40.0 $\mu\text{g/mL}$ en diluciones cuádruples) en un volumen total de 100 μL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS. La muerte máxima mediada por CDC se calculó a partir de dos experimentos independientes utilizando los valores superiores de mejor ajuste de un ajuste no lineal en GraphPad PRISM 5.

La Figura 22A-D muestra que la introducción de E345R en el rituximab de tipo silvestre resultó en una eficacia CDC mejorada como se observa por un aumento de la lisis máxima y una disminución de la EC_{50} para todas las líneas de células B probadas.

La Figura 22E muestra que la muerte máxima mediada por CDC inducida por el mutante rituximab-E345R fue siempre mayor que por el rituximab de tipo silvestre, independientemente de los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana. Estos datos indican que la introducción de E345R aumenta el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales, ya que las células tumorales son menos eficaces para evadir el ataque del complemento mediado por anticuerpos que contienen E345R.

Ejemplo 28

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

Se ha demostrado que la introducción de la mutación E345R estabilizadora de la interacción Fc:Fc mejora o rescata la CDC como se observa por la disminución de los valores de EC_{50} y el aumento de la lisis máxima para diferentes anticuerpos en diferentes líneas celulares descritas en el Ejemplo 6 (anticuerpo CD20 7D8 en Daudi y Raji), Ejemplo 10 (anticuerpo CD38 005 en Daudi, Raji y Wien133) y Ejemplo 25 (anticuerpo CD38 003 y anticuerpos CD20 rituximab y 11B8 en Daudi y Wien133). A continuación, se analizó la cinética de las reacciones CDC para desentrañar aún más la diferencia en la eficacia CDC entre los anticuerpos de tipo silvestre y E345R.

Se preincubaron 0.1×10^6 células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación (10.0 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, que variaron entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 23A muestra que el anticuerpo CD20 IgG1-7D8 de tipo silvestre mostró una muerte máxima mediada por CDC del 80% de las células Raji, que ya se alcanzó después de 5 min en las condiciones probadas. Sin embargo, en el caso de IgG-7D8-E345R, la muerte del 80% de las células Raji se observó incluso más rápidamente, después de 3 min. La lisis máxima por IgG-7D8-E345R (95%) también se alcanzó a los 5 minutos.

La Figura 23B muestra que también para el anticuerpo CD20 de tipo silvestre rituximab, que es menos potente que 7D8 para inducir CDC en las células Raji usadas, la introducción de la mutación E345R resultó en una muerte más rápida de las células diana. El rituximab de tipo silvestre mostró una muerte máxima mediada por CDC del 32%, que se alcanzó a los 20 minutos. Rituximab-E345R alcanzó el 32% de muerte ya después de aproximadamente 3 minutos y, notablemente, la lisis máxima por rituximab-E345R (85%) también se alcanzó después de 20 minutos.

La Figura 23C+D muestra que las células Raji utilizadas, que son resistentes a la muerte mediada por CDC por los anticuerpos CD38 de tipo silvestre IgG1-003 e IgG1-005, podían matarse rápidamente introduciendo la mutación

E345R. IgG1-003-E345R e IgG1-005-E345R mostraron una CDC máxima (50% y 60%, respectivamente) ya después de 5 min.

En resumen, los anticuerpos E345R son más potentes que sus homólogos de tipo silvestre, lo que resulta de una combinación de mayor eficacia (EC_{50} inferior), mayor lisis máxima y una cinética más rápida de la reacción CDC.

5 Ejemplo 29

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

En el ejemplo 23 se describe que la mutación E345R puede aplicarse al anticuerpo biespecífico CD38xCD20 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R que se generó mediante la plataforma DuoBody, lo que da como resultado una mayor capacidad de muerte observada por una disminución de la EC_{50} en ensayos de CDC en células Raji y Wien133. A continuación, se analizó la cinética de la reacción CDC para desentrañar mejor la diferencia en la eficacia CDC entre los anticuerpos biespecíficos CD38xCD20 con y sin E345R.

Se preincubaron 0.1×10^6 células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación (10.0 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, que variaron entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La figura 24 muestra que el anticuerpo biespecífico IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R indujo una muerte máxima mediada por CDC del 83%, que se alcanzó al cabo de 10 minutos. La introducción de E345R provocó un aumento de la muerte máxima por IgG1-005-E345R-F405L x IgG1-7D8-E345R-K409R (98%), que ya se alcanzaba a los 2 minutos. Estos datos indican que la introducción de la mutación E345R estabilizadora de Fc-Fc en el anticuerpo biespecífico produce una muerte acelerada de las células diana mediada por CDC.

Ejemplo 30

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

El Ejemplo 22 muestra que la unión monovalente a la diana mejoró aún más la eficacia CDC de los anticuerpos E345R, como se observó por el aumento de la lisis máxima con un anticuerpo CD38xEGFR biespecífico en las células Wien133 CD38-positivas, EGFR-negativas. A continuación, se analizó la cinética de la reacción CDC para desentrañar aún más la diferencia en la capacidad de muerte mediada por CDC entre los anticuerpos de unión monovalente con y sin E345R.

Los anticuerpos biespecíficos CD38xEGFR y CD20xEGFR, con o sin la mutación E345R, se generaron *in vitro* según la plataforma DuoBody como se describe en el Ejemplo 22. La eficacia CDC de los anticuerpos biespecíficos CD38xEGFR se probó en las células Raji CD38-positivas, EGFR-negativas, a las que los anticuerpos biespecíficos sólo pueden unirse monovalentemente a través de CD38. Se preincubaron 0.1×10^6 células Raji en placas de 96 pocillos de fondo redondo con anticuerpo a una concentración de saturación (10.0 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen total de 100 μL durante 15 min en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μL de suero humano normal como fuente de complemento (20% de concentración final) y se incubaron en un incubador a 37°C durante diferentes periodos de tiempo, que variaron entre 0 y 60 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 μL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 25 muestra que el anticuerpo biespecífico CD38xEGFR (IgG1-005-K409R x IgG1-2F8-F405L) indujo una muerte máxima mediada por CDC del 55%, que se alcanzó después de aproximadamente 10 minutos. La introducción de E345R provocó un aumento de la muerte máxima (96%), que se alcanzó en 5 minutos.

La Figura 25 muestra que el anticuerpo biespecífico CD20xEGFR (IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L) indujo una muerte máxima mediada por CDC del 85%, que se alcanzó después de aproximadamente 5 minutos. Sin embargo, con el anticuerpo CD20xEGFR con E345R introducido, se observó una lisis del 85% más rápida, al cabo de 2 minutos. La lisis máxima por el anticuerpo CD20xEGFR E345R (97%) también se alcanzó a los 5 minutos.

En resumen, la introducción de la mutación E345R en estos anticuerpos de unión monovalente resultó en anticuerpos más potentes, lo que resulta de una combinación de lisis máxima aumentada y una cinética más rápida de la reacción CDC.

Ejemplo 31

CDC por una combinación de anticuerpos terapéuticos y E345R/Q386K

Como se describe en el Ejemplo 19, los anticuerpos CD38 mutantes derivados de IgG1-005 podían inducir CDC eficiente en células Wien133 cuando la posición E345 del anticuerpo de tipo silvestre se sustituía por cualquier aminoácido distinto de Glutamato (E). Esto sugiere que la oligomerización, como requisito previo de la CDC, se ve obstaculizada por la presencia de la cadena lateral de glutamato en la posición 345 del anticuerpo. Dado que E345 en

un Fc está muy cerca de Q386 en la segunda molécula Fc opuesta en la estructura de anillo hexamérica del anticuerpo, el impedimento de oligomerización mediado por E345 en un primer anticuerpo podría eliminarse mediante sustituciones en la posición Q386 de un segundo anticuerpo. Esto permitiría al E345 del primer anticuerpo interactuar mejor con la posición 386 mutada del segundo anticuerpo en caso de que ambos anticuerpos se combinaran. Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos CDC en Wien133, en los que se mezclaron anticuerpos de tipo silvestre (IgG1-003, IgG1-005 o IgG1-11B8) con IgG1-005-E345R/Q386K o IgG1-005-E345R/Q386K/E430G, a modo de ejemplo.

Se preincubaron 0.1×10^6 células Wien133 en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de IgG1-005-E345R/Q386K no purificada, IgG1-005-E345R/Q386K/E430G o anticuerpo de control (0.0001-20.0 µg/mL en diluciones de 3.33 veces) en presencia o ausencia de 1.0 o 10.0 µg/mL de anticuerpo IgG1-003, IgG1-005 o IgG1-11B8 de tipo silvestre en un volumen total de 100 µL durante 15 minutos en un agitador a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 26A/B/C muestra que el anticuerpo CD38 IgG1-005-E345R/Q386K indujo la lisis mediada por CDC de células Wien133 de forma dependiente de la dosis (línea discontinua). La combinación de IgG1-005-E345R/Q386K con 1 o 10 µg/mL de anticuerpo CD38 de tipo silvestre IgG1-003 (Figura 26A) o de anticuerpo CD20 de tipo silvestre IgG1-11B8 (Figura 26B) produjo un aumento de la lisis celular máxima. La combinación de IgG1-005-E345R/Q386K con IgG1-005 de tipo silvestre inhibió la CDC de forma dependiente de la dosis, posiblemente compitiendo por el sitio de unión (Figura 26C).

La Figura 26D/E/F muestra resultados similares para el anticuerpo CD38 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G.

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

El Ejemplo 19 describe múltiples aminoácidos además de E345 que potencian la CDC tras mutación, por ejemplo E430 y S440, cuyas mutaciones específicas indujeron CDC eficiente en células Wien133 cuando se incorporaron en el anticuerpo CD38 IgG1-005. Con la excepción de los mutantes I253 e Y436, las mutaciones identificadas que potencian la oligomerización contactan con aminoácidos no mutados de la segunda fracción Fc orientada en la estructura anular hexamérica. Por lo tanto, cabe esperar que las mutaciones identificadas que potencian la oligomerización, tanto solas como combinadas, también promuevan la oligomerización con anticuerpos no mutados, y podría conseguirse una mayor optimización de tales mutantes mediante una estrategia de selección similar a la aplicada en el ejemplo 19.

Ejemplo 32

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

Para probar si la introducción de mutaciones promotoras de la oligomerización puede estimular la actividad CDC de isotipos de anticuerpos no IgG1, se generaron variantes isotípicas del anticuerpo CD38 IgG1-005 con dominios constantes de IgG2, IgG3 o IgG4 humanos dando IgG2-005, IgG3-005 e IgG4-005 por métodos conocidos en la técnica. Además, en todos estos anticuerpos se introdujo la mutación E345R que potencia la oligomerización, obteniéndose IgG2-005-E345R, IgG3-005-E345R e IgG4-005-E345R. De forma similar, también se generaron IgG2-003 e IgG2-003-E345R a partir del anticuerpo CD38 IgG1-003. La eficacia CDC de los diferentes isotipos se comparó en un ensayo CDC *in vitro*.

Se preincubaron 0.1×10^6 células Wien133 en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 10 µg/mL de anticuerpos no purificados en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. Se añadió IgG1-005-E345R a 3.0 µg/mL. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS.

La Figura 27 muestra que las IgG2-005, IgG2-003, IgG3-005 e IgG4-005 no pudieron lisar eficientemente ni (A) células Daudi ni (B) células Wien133 en las condiciones ensayadas (la lisis observada de ~20% se consideró como fondo). La introducción de la mutación E345R permitió una potente CDC en células Daudi por parte de todos los isotipos de IgG ensayados. Estos resultados se confirmaron utilizando CDC en células Wien133, aunque la IgG3-005-E345R mostró una actividad CDC limitada en relación con las otras variantes isotípicas. Estos datos indican que, además de la IgG1, también puede aplicarse una mutación potenciadora de la oligomerización como la E345R para promover la actividad CDC de los anticuerpos IgG2, IgG3 e IgG4.

Ejemplo 33

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

Se obtuvieron células primarias criopreservadas de muestras de pacientes con CLL del biobanco de hematopatología del CDB-IDIBAPS-Hospital Clínic (Dr. Elias Campo, Unidad de Hematopatología, Departamento de Patología, Hospital Clínic, Institut d'Inves (Dr. Elias Campo, Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, España), o de estudios clínicos del National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) (Dr. Adrian Wiestner, NHLBI, Hematology Branch of the National Institutes of Health (NIH), Bethesda). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes de acuerdo con el Comité de Ética Institucional del Hospital Clínic (Barcelona, España) o la Junta de Revisión Institucional de los NIH y la Declaración de Helsinki. Todas las muestras se caracterizaron genética e inmunofenotípicamente.

Las muestras de CLL se clasificaron en dos grupos según su expresión de CD38 determinada por FACS: cinco muestras se incluyeron en el grupo de CD38 alta (entre 50% y 98% de la expresión de CD38 en células Daudi) y cuatro muestras se incluyeron en el grupo de CD38 baja (entre 0.5% y 3% de la expresión de CD38 en células Daudi).

Células CLL marcadas fluorescentemente (marcadas con 5 μ M Calcein AM) fueron incubadas con una serie de concentración de anticuerpo (0.01-10 μ g/mL en diluciones de 10 veces). A continuación, se añadió suero humano normal a las células opsonizadas con anticuerpo (100.000 células/pocillo) como fuente de complemento (concentración final del 10%) y se incubaron durante 45 min a 37°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se leyó la fluorescencia en un fluorómetro SynergyTM HT como medida de la lisis celular. La muerte celular se calculó del siguiente modo

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

La Figura 28 muestra que la IgG1-005-E345R mejoró fuertemente la eficacia de CDC en comparación con la IgG1-005 de tipo silvestre tanto en células primarias de CLL con alta expresión de CD38 como en células primarias de CLL con baja expresión de CD38.

Ejemplo 34

Unión a FcRn de mutantes IgG1-005 en comparación con IgG1-005 de tipo silvestre

El receptor Fc neonatal (FcRn) es responsable de la larga vida media plasmática de la IgG al protegerla de la degradación. Tras la internalización del anticuerpo, el FcRn se une a las regiones Fc del anticuerpo en los endosomas, donde la interacción es estable en el entorno ligeramente ácido (pH 6.0). Al reciclarse a la membrana plasmática, donde el entorno es neutro (pH 7.4), la interacción se pierde y el anticuerpo se libera de nuevo a la circulación. Esto influye en la semivida plasmática de la IgG.

La capacidad de los mutantes IgG1-005 E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430F, E430G, E430S, E430T, S440Y, K439E y S440K para interactuar con FcRn de ratón, mono cynomolgus y humano se probó en un ELISA. En el ELISA de FcRn de ratón también se probaron los mutantes P247G y I253D. I253D se utilizó como control negativo para la unión a FcRn. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 5 μ g/mL (100 μ L/pocillo) de dominio extracelular biotinilado recombinantemente producido de FcRn (ratón, humano o cynomolgus) (FcRnECDHis-B2M-BIO), diluido en PBST más 0.2% de BSA, y se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces con PBST, y se añadieron 3 veces diluidas en serie (en PBST/0.2% BSA, pH 6.0) IgG1-005 o 005 mutantes de tipo silvestre, y las placas se incubaron durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBST/0.2% BSA, pH 6.0. Se añadió IgG(Fab'2)-HRP antihumana de cabra (Jackson Immuno Research, cat no: 109-035-097) diluida en PBST/0.2% BSA, pH 6.0, y se incubaron las placas durante 1 hora. Tras el lavado, se añadió ABTS como sustrato y las placas se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se leyó a 405 nm, utilizando un lector ELISA EL808. Los datos generados en el ELISA de FcRn de ratón se analizaron utilizando los valores de mejor ajuste de un ajuste dosis-respuesta agonista no lineal utilizando concentraciones transformadas logarítmicamente en GraphPad PRISM 5 y se calculó la afinidad aparente (EC50) (Tabla 20). El experimento muestra que la unión a FcRn no se vio alterada por ninguno de los mutantes IgG1-005 en comparación con la IgG1-005 de tipo silvestre.

Tabla 20 Afinidad aparente (EC50) en μ g/ml de IgG1-005 y mutantes al FcRn de ratón

Variantes probadas	005-WT	005-P247G	005-E345K	005-E345N	005-E345Q	005-E345R	005-E345Y	005-E430F
Afinidad aparente	0.14	0.28	0.10	0.11	0.12	0.09	0.13	0.11

Variante probada	005-WT	005-P247G	005-E345K	005-E345N	005-E345Q	005-E345R	005-E345Y	005-E430F
Variante probada	005-E440Y	005-E430G	005-E430H	005-E430S	005-E430T	005-E440K	005-E439E	
Afinidad aparente	0.15	0.13	0.11	0.14	0.15	0.11	0.31	

La Figura 29 muestra que la IgG1-005 de tipo silvestre y todos los mutantes probados de IgG1-005 se unieron bien al FcRn de ratón, humano y de cynomolgus a pH 6.0. No se detectó ninguna unión significativa al FcRn a pH 7.4 (datos no mostrados). No se detectó ninguna unión significativa a FcRn a pH 7.4 (datos no mostrados).

5 Ejemplo 35

CDC mejorada por diferentes mutaciones en rituximab en las líneas de células B Ramos y SU-DHL-4

Como se describe en el Ejemplo 19, la oligomerización y la actividad CDC del anticuerpo anti-CD38 IgG1-005 pueden estimularse mediante mutaciones únicas en residuos específicos en o en la periferia de la interfaz Fc:Fc. La oligomerización también puede ser estimulada indirectamente por otro tipo de mutaciones en residuos alejados de la interfaz Fc:Fc que refuerzan alostéricamente las interacciones Fc:Fc. Esto también se probó para el anticuerpo IgG1 anti-CD20 rituximab en dos líneas de células B (Ramos y SU-DHL-4). Se probaron las siguientes mutaciones: E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430G, E430S, E430T y S440Y (esencialmente como se describe en el Ejemplo 19).

Para el ensayo CDC, se preincubaron 0.1×10^6 de células (Ramos o SU-DHL-4) en placas de 96 pocillos de fondo redondo con una serie de concentraciones de anticuerpos de saturación (0.0001-10.0 µg/mL en diluciones de 3 veces) en un volumen total de 100 µL durante 15 min en un agitador a TA. A continuación, se añadieron 25 µL de suero humano normal como fuente de complemento (concentración final del 20%) y se incubaron en un incubador a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo poniendo las placas en hielo. Se añadieron 10 µL de yoduro de propidio y se determinó la lisis celular mediante FACS. Los datos se analizaron utilizando los valores de mejor ajuste de un ajuste dosis-respuesta agonista no lineal utilizando concentraciones transformadas logarítmicamente en GraphPad PRISM 5. La Figura 30 muestra que todos los mutantes de rituximab ensayados fueron capaces de aumentar la eficacia de CDC en ambas líneas de células B.

Ejemplo 36

Activación del complemento en fase fluida independiente de la diana: Mutantes de IgG1-005 comparados con IgG1-005 de tipo silvestre

La activación del complemento independiente de la diana puede constituir un problema de seguridad cuando un anticuerpo activa el complemento en, por ejemplo, el torrente sanguíneo o en el tejido de un órgano. Esto puede dar lugar a productos de activación del complemento no deseados o a una deposición del complemento no deseada. Para comprobar la activación del complemento en fase fluida independiente de la diana, se incubaron 100 µg/ml de los mutantes IgG1-005 E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430F, E430G, E430S, E430T, S440Y, IgG1-005 de tipo silvestre o IgG agregada por calor (HAG, control positivo) en suero humano normal al 90% durante 1 hora a 37°C. A continuación, las muestras se transfirieron a un ELISA para su análisis. A continuación, las muestras se transfirieron a un kit ELISA para medir la generación de C4d (Micro Vue C4d-fragment, Quidel, San Diego, CA, EE.UU.). C4d es un fragmento de activación de C4 que es un marcador de la activación de la vía clásica del complemento.

La figura 31 muestra que IgG1-005 de tipo silvestre, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, e IgG1-005-S440Y muestran una activación C4 mínima, mientras que las IgG1-005-E345R, IgG1-005-E430F e IgG1-005-E430T muestran una mayor generación de C4d (activación de C4) en comparación con la IgG1-005 de tipo silvestre.

Ejemplo 37

Tasas de depuración plasmática de mutantes IgG1-005 en comparación con IgG1-005 de tipo silvestre

Los ratones de este estudio se alojaron en una unidad de barrera de la Instalación Central de Animales de Laboratorio (Utrecht, Países Bajos) y se mantuvieron en jaulas con tapa de filtro con agua y comida suministradas ad libitum. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht. Los ratones SCID (C.B-17/lcr-Prkdc^{scid}/lcr-lcoCrl, Charles-River) fueron inyectados por vía intravenosa con 500 µg de anticuerpo, utilizando 3 ratones por grupo.

Se tomaron muestras de sangre de 50 µL de la vena safena a los 10 minutos, 4 horas, 1 día, 2 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la administración del anticuerpo. La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se

centrifugó durante 5 minutos a 10.000 g. El plasma se almacenó a -20°C hasta la determinación de las concentraciones de anticuerpos.

Las concentraciones específicas de IgG humana se determinaron utilizando un ELISA sándwich específico de hIgG total y CD38.

- 5 Para el ELISA de hIgG total, se utilizó mAb de ratón anti-IgG-kappa humana clon MH16 (#M1268, CLB Sanquin, Países Bajos), recubierto en placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL como anticuerpo de captura. Tras bloquear las placas con PBS suplementado con 0.2% de albúmina de suero bovino, se añadieron las muestras, se diluyeron en serie con tampón ELISA (PBS suplementado con 0.05% de Tween 20 y 0.2% de albúmina de suero bovino) y se incubaron en un agitador de placas durante 1 h a temperatura ambiente (TA).
- 10 A continuación, se incubaron las placas con inmunoglobulina IgG antihumana de cabra (No. 109-035-098, Jackson, West Grace, PA) y se revelaron con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

- Para el ELISA específico de CD38, el dominio extracelular de CD38 marcado con His se recubrió con placas de ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL. Tras bloquear las placas con tampón ELISA, se añadieron muestras diluidas en serie con tampón ELISA y se incubaron en un agitador de placas durante 1 h a temperatura ambiente (TA).
- 15 A continuación, se incubaron las placas con 30 ng/ml de IgG1-HRP antihumana de ratón (Sanquin M1328, clon MH161-1) y se revelaron con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

- La figura 32A muestra las tasas de depuración de IgG del anticuerpo de referencia de tipo natural IgG1-005 y de las variantes de anticuerpo IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430F, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430T, IgG1-005-S440Y. Las mutantes IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430G e IgG1-005-S440Y, IgG1-005-E430T, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q e IgG1-005-E345Y mostraron tasas de depuración similares a las de la IgG1-005 de tipo silvestre. Los mutantes IgG1-005-E430F e IgG1-005-E345R mostraron una depuración más rápida. La tasa de depuración plasmática se calculó como la dosis/AUC (mL/día/kg).
- 20 El valor AUC (área bajo la curva) se determinó a partir de las curvas concentración-tiempo.
- 25

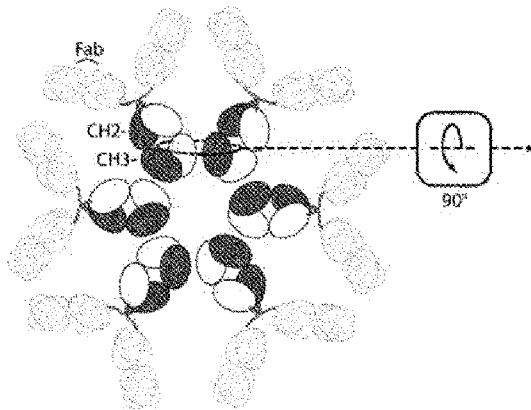
- La Figura 32B muestra las tasas de depuración de IgG determinadas por ELISA específico de CD38 del anticuerpo de referencia de tipo silvestre IgG1-005 y de las variantes de anticuerpo IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, e IgG1-005-S440Y cuando se inyectaron por vía intravenosa un día después de la administración intraperitoneal de 8.0 mg de anticuerpo de control IgG1-B12 irrelevante. Se incluyó como control el anticuerpo de referencia de tipo silvestre IgG1 en ausencia del control irrelevante b12. Los mutantes IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430G, IgG1-005-S440Y e IgG1-005-E345K mostraron tasas de depuración similares a las del tipo silvestre. La mutante IgG1-005-E345R mostró una depuración más rápida.
- 30

REIVINDICACIONES

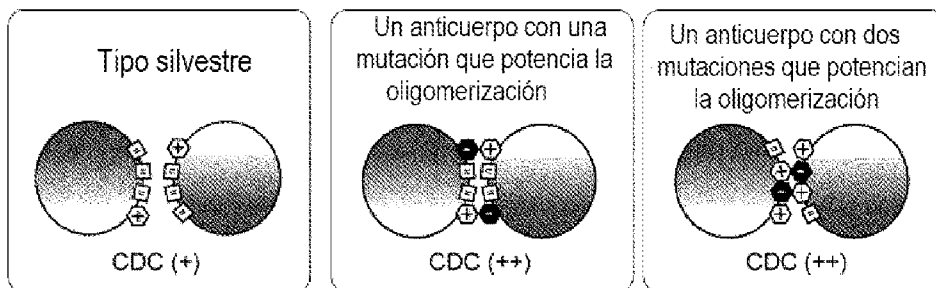
1. Un método para aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ex vivo, sin alterar la activación del complemento independiente de la diana en fase fluida de un anticuerpo progenitor que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina y una región de unión, cuyo método comprende introducir una mutación en el anticuerpo progenitor en un residuo de aminoácido correspondiente a E430G o E430S en la región Fc de una cadena pesada IgG1 humana, evaluar la respuesta CDC inducida por el anticuerpo variante cuando se une a la superficie de una célula que expresa antígeno en presencia de células efectoras o complemento en comparación con el anticuerpo progenitor; evaluar la actividad del complemento en fase fluida independiente de la diana del anticuerpo variante en comparación con el anticuerpo progenitor incubando el anticuerpo en suero humano normal y determinando la generación de C4d en comparación con el anticuerpo progenitor; y seleccionar un anticuerpo variante que tenga una respuesta CDC aumentada y una activación del complemento en fase independiente de la diana inalterada.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo progenitor es un anticuerpo monoespecífico, biespecífico o multiespecífico.

Figura 1

A) Moléculas IgG en formación de hexámero



B) Efecto observado de mutaciones que potencian la oligomerización en CDC



C) Efecto observado de mutaciones que inhiben la oligomerización en CDC

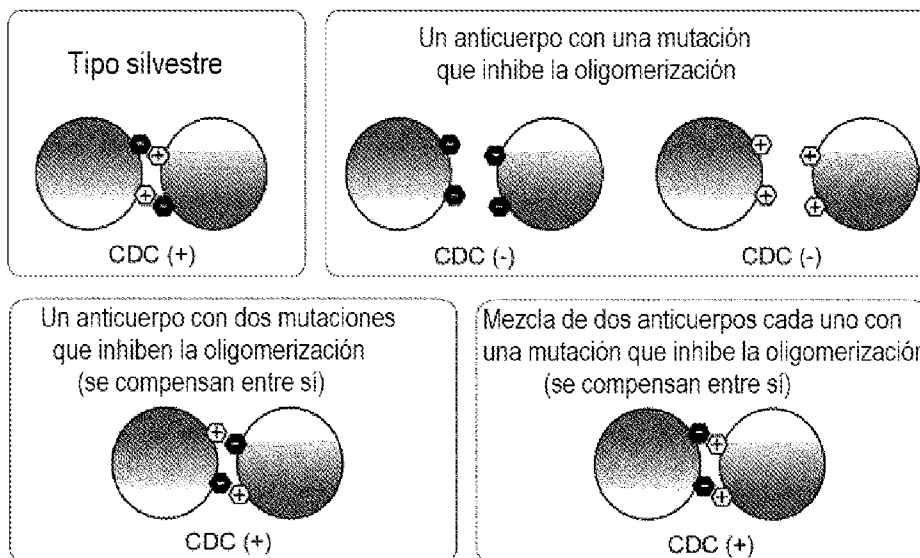


Figura 1D

D) Efecto teórico de mutaciones que inhiben la unión a C1q en CDC

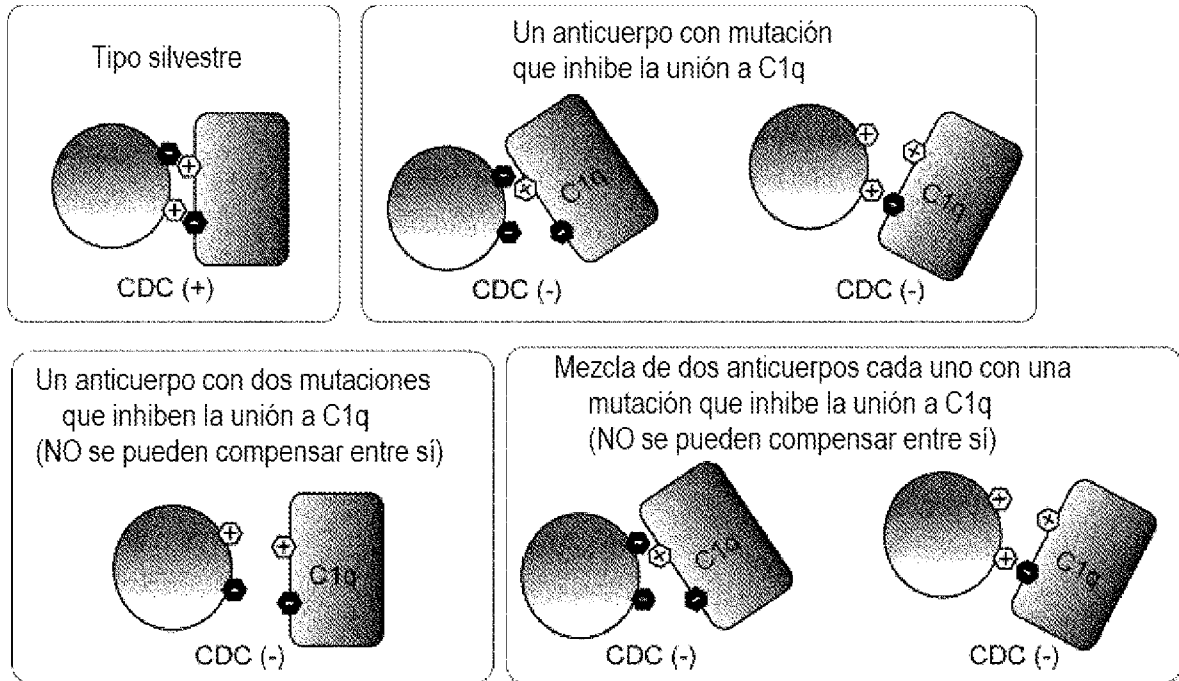


Figura 2

IgG1 247 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL 306
IgG1f PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
IgG2 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
IgG3 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVL
IgG4 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
IgE SPFDLFIKSPSPTITCLVLDLAPSKGTVNLTSWRSAGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTL
IgA1 ALEDLLLGSEANLTCITLTGLRDASG-VTFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSSVL
IgA2 ALEDLLLGSEANLTCITLTGLRDASG-ATFTWTPSSGKSAVQGP--PERDLGCGYSVSSVL
IgM SFASIFLTKSTKLTCITLTDLTYS-VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEA
IgD AVQDLWLRLDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAG-KVPTGGVEEGLLERHSNGSQHSRL

```

IgG1    307  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK-NQVS 364
IgG1f   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
IgG2    TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS-KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
IgG3    TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS-KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK-NQVS
IgG4    TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIIEKTIS-KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK-NQVS
IgE     PVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTT-KTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSR-DKRT
IgA1    PGCAEPWNHGTKTFTCTAAYPESKTFLTATLS--KSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVT
IgA2    PGCAQPNWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANIT--KSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVT
IgM     SICEDDWSNGERFTCTVTHTDLPSPFKQTISRPGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESAT
IgD     TLPRLSNWAGTSVTCTLNLHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAA---SW
          .      *      *      *

```

```

IgG1 365 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ 419
IgG1f LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG2 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPMLDS---DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG3 LTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQ--PENNYNTTTPMLDS---DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQ
IgG4 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPVLDS---DGSEFFLYSRLTVDKSRWQE
IgE LACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTK---GSGEFFVFSRLLEVTRAWEQ
IgA1 LTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWKK
IgA2 LTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWKK
IgM ITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEP-QAPGRYFAHSILTVSEEWNT
IgD LLCEVSGFSPENILLMWLDQREVNTSGFAPARPPPQP--GSTTEFAWSVLRVPAPPSPQ
      : *      * * * : : *

```

```

IgG1    420  GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK----- 447
IgG1f   GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----
IgG2    GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----
IgG3    GNIFSCSVMHEALHN-RFTQKSLSLSPGK-----
IgG4    GNVFSCSVMHEALHN-HYTQKSLSLSLGK-----
IgE     KDEFICRAVHEAASPQTQVQRAVSVMNPGK-----
IgA1    GDTFSCMVGHEALPL-AFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
IgA2    GDTFSCMVGHEALPL-AFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
IgM     GETYTCVA-HEALPN-RVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
IgD     PATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLVSVYTDHGPMPK-----
          : * **

```

Figura 2 (cont.)

IgG1 = aa 130-330 de entrada Uniprot P01857
 IgG1f= IgG1 variante alotópica "f"
 IgG2 = aa 126-326 de entrada Uniprot P01859
 IgG3 = aa 177-377 de entrada Uniprot P01860
 IgG4 = aa 127-327 de entrada Uniprot P01861
 IgE = aa 225-428 de entrada Uniprot P01854
 IgA1 = aa 133-353 de entrada Uniprot P01876
 IgA2 = aa 120-340 de entrada Uniprot P01877
 IgM = aa 230-452 de entrada Uniprot P01871
 IgD = aa 176-384 de entrada Uniprot P01880

Figura 3B

[illegible]

Figura 4

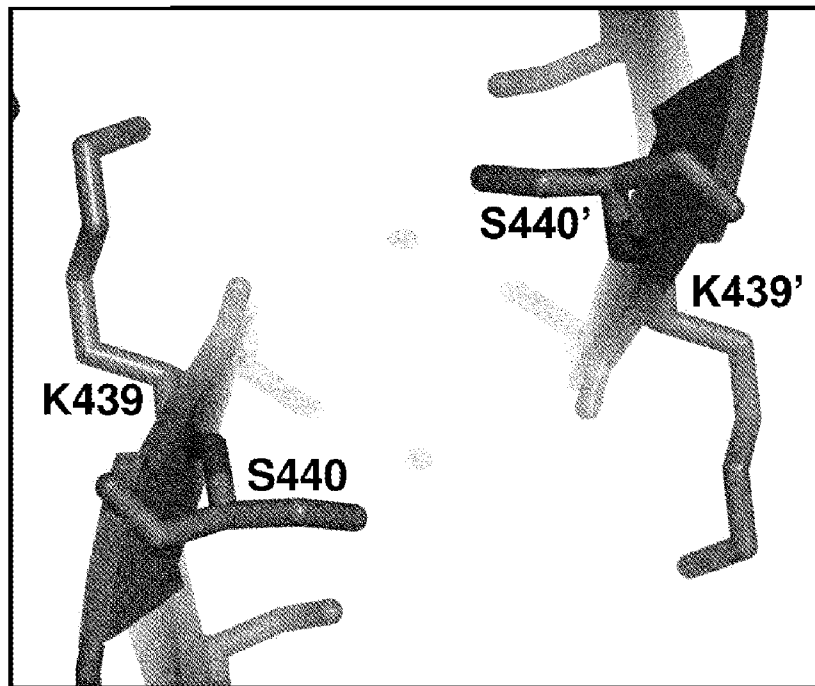


Figura 5

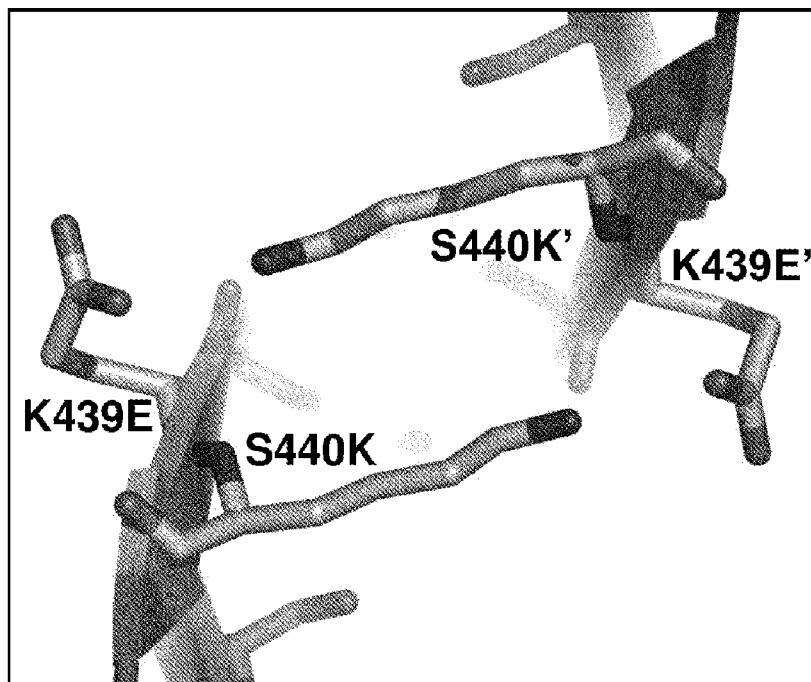


Figura 6

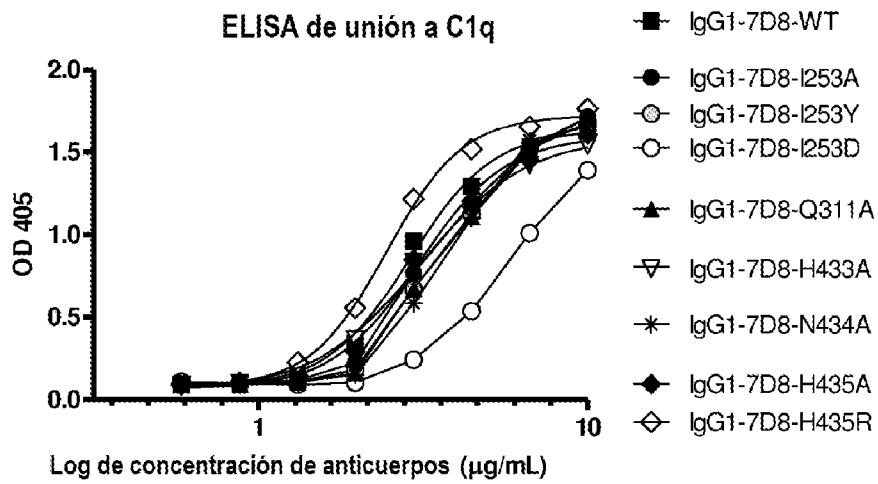


Figura 7

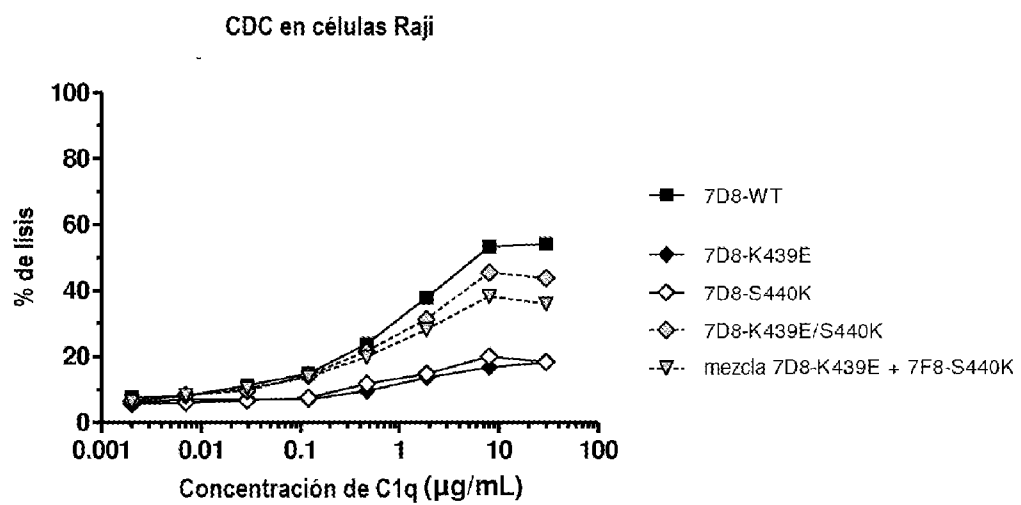


Figura 8

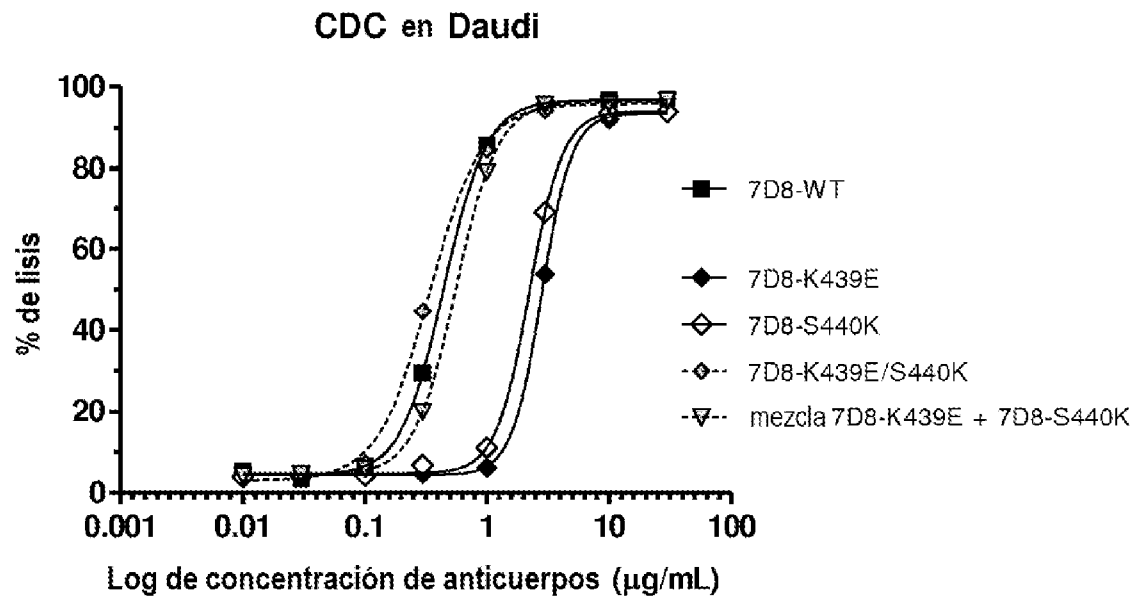


Figura 9A

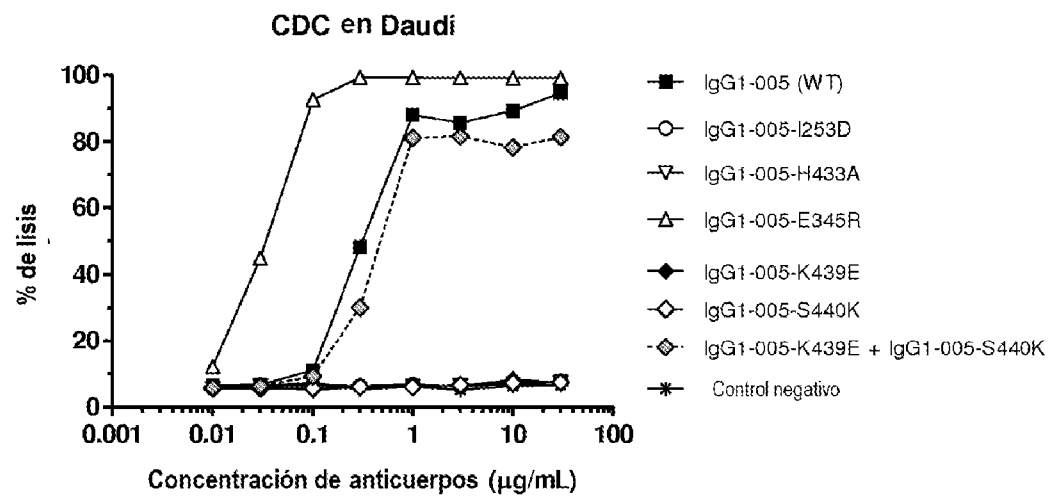


Figura 9B

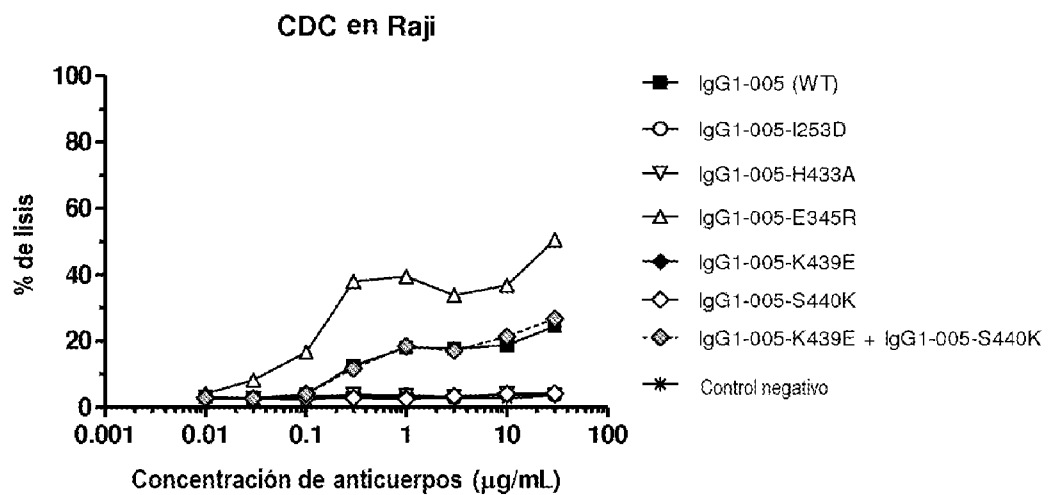


Figura 9C

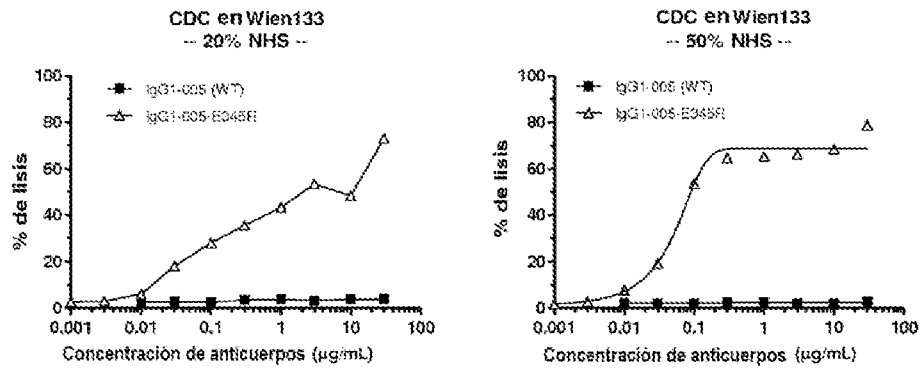


Figura 9D

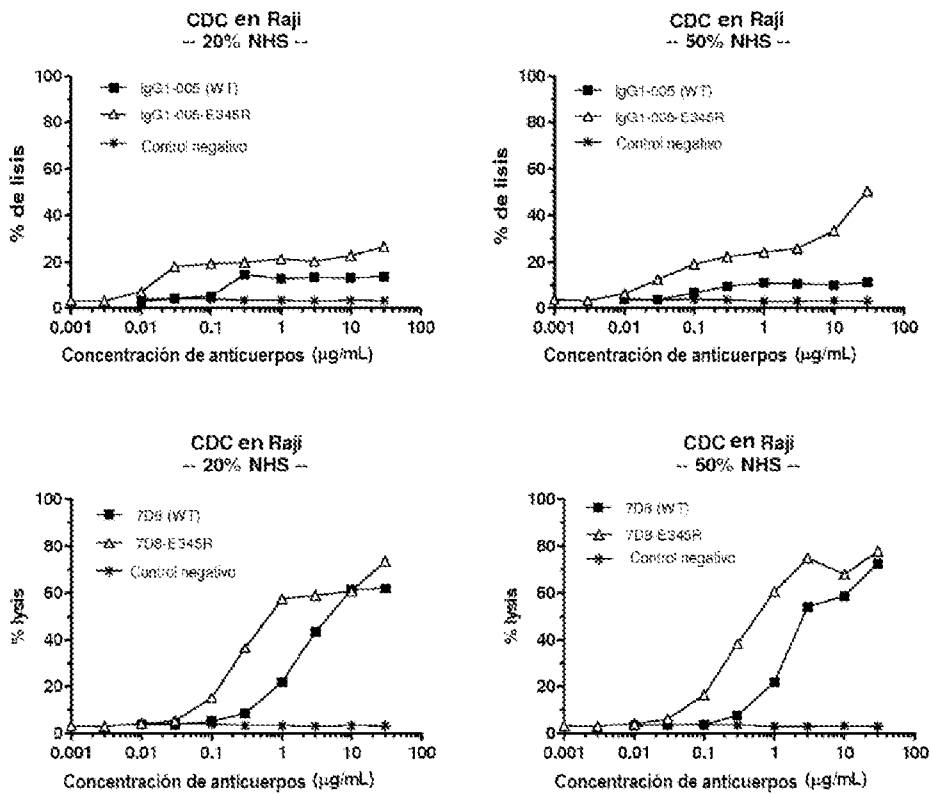


Figura 10A

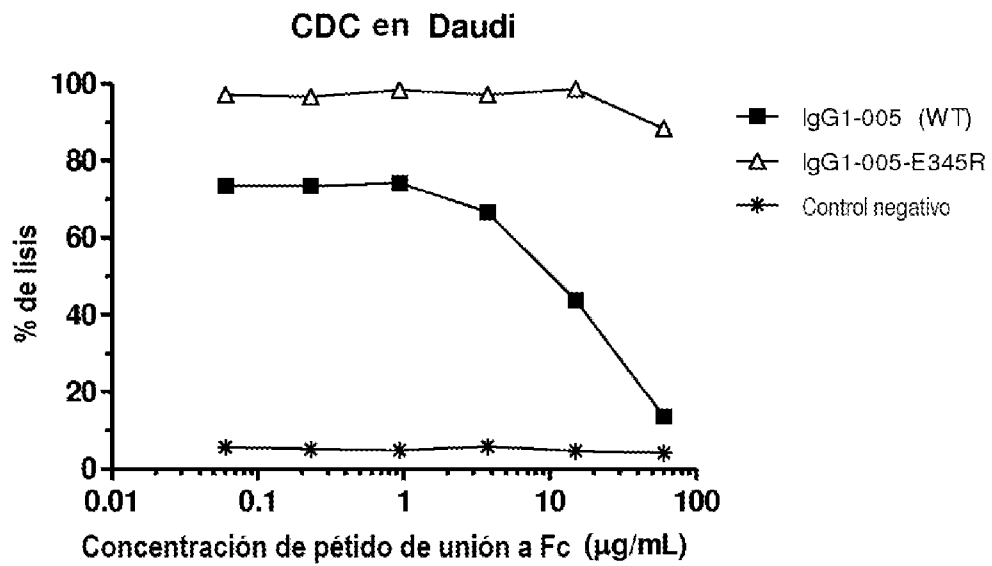


Figura 10B

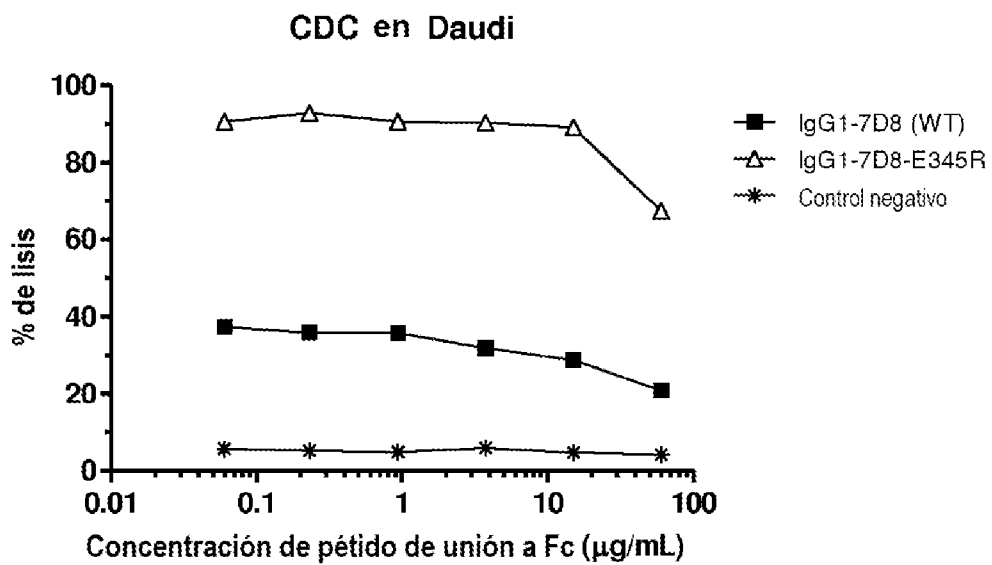


Figura 11

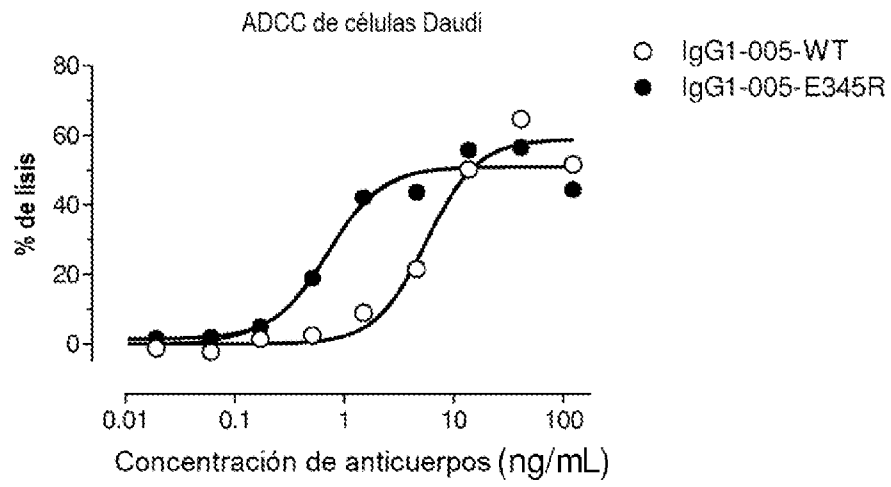


Figura 12A

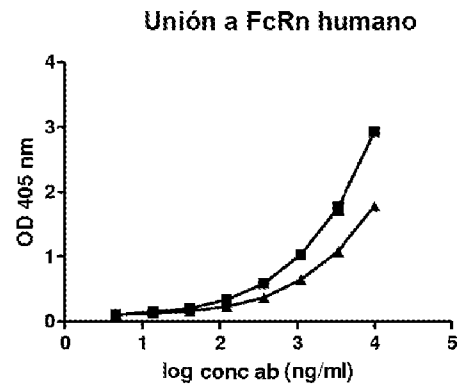


Figura 12B

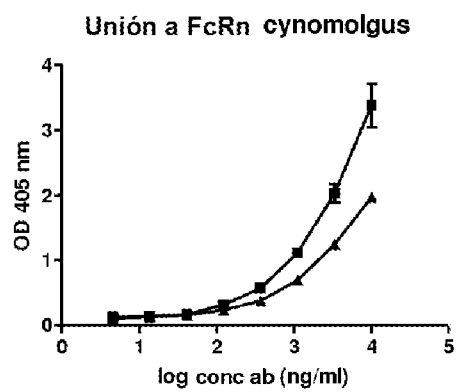


Figura 12C

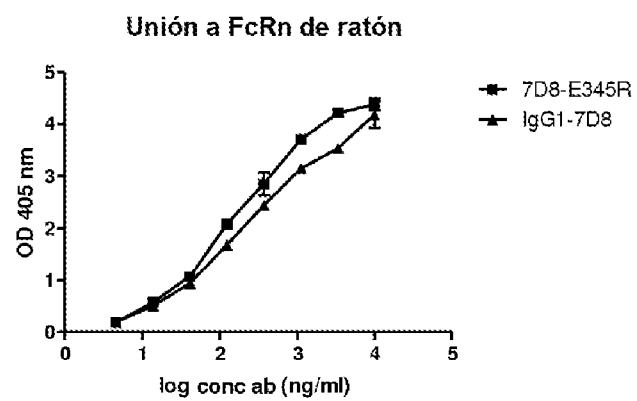


Figura 13

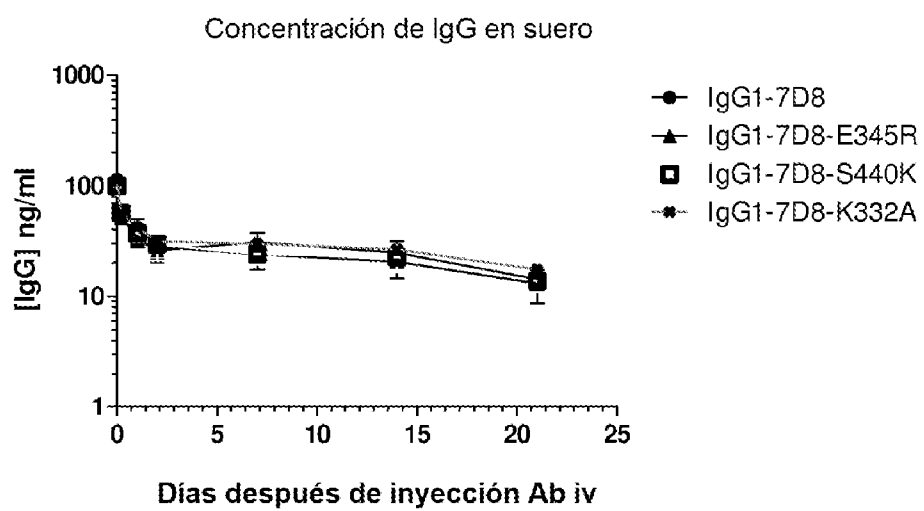


Figura 14A

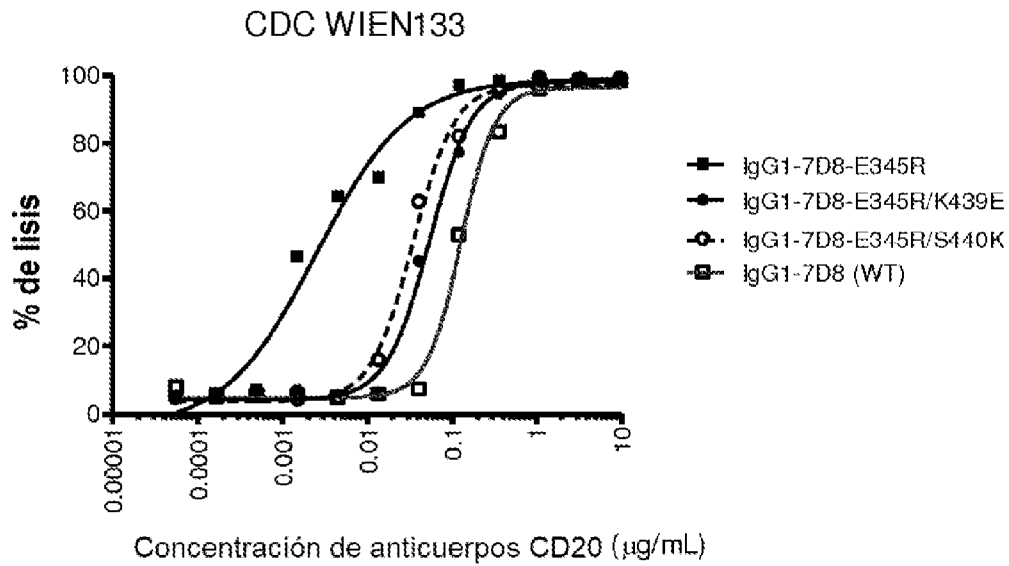


Figura 14B

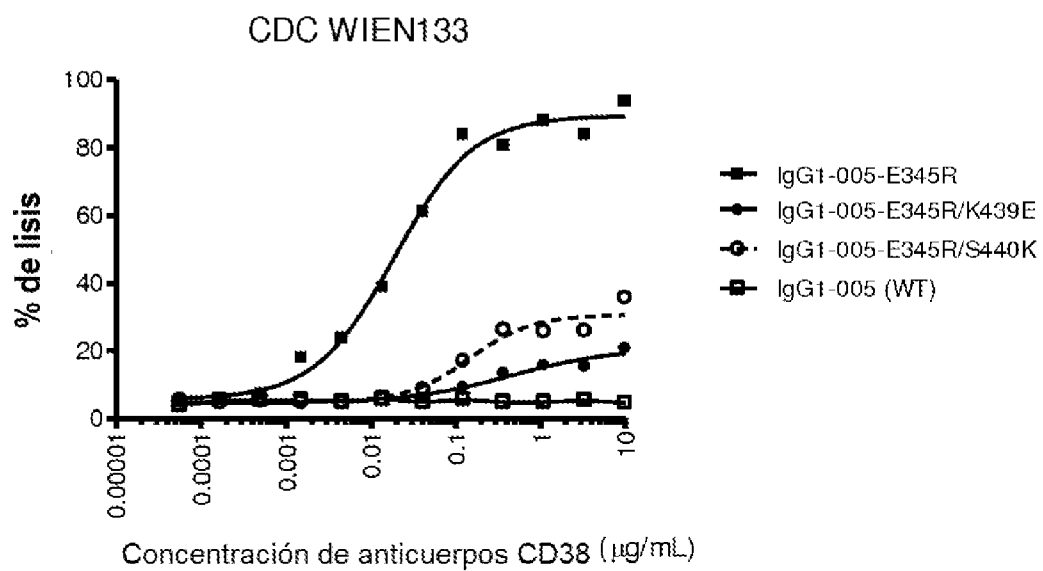


Figura 14C

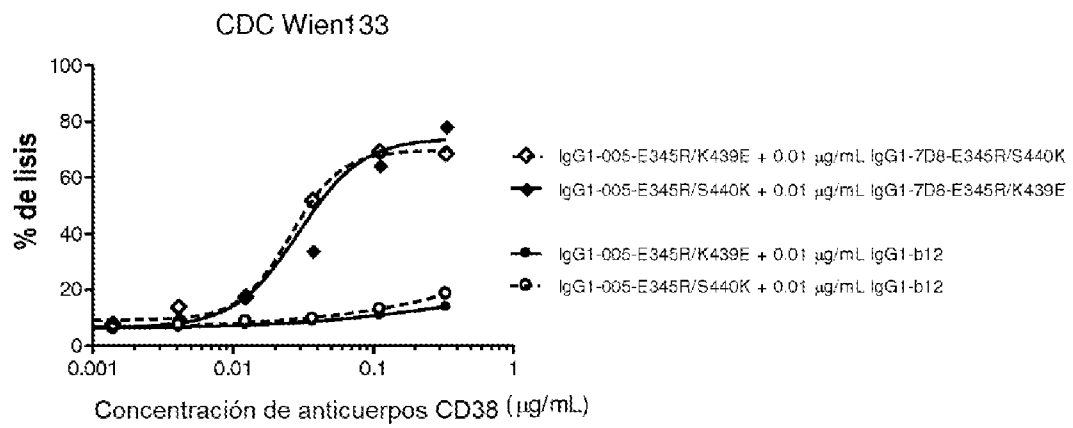


Figura 14D

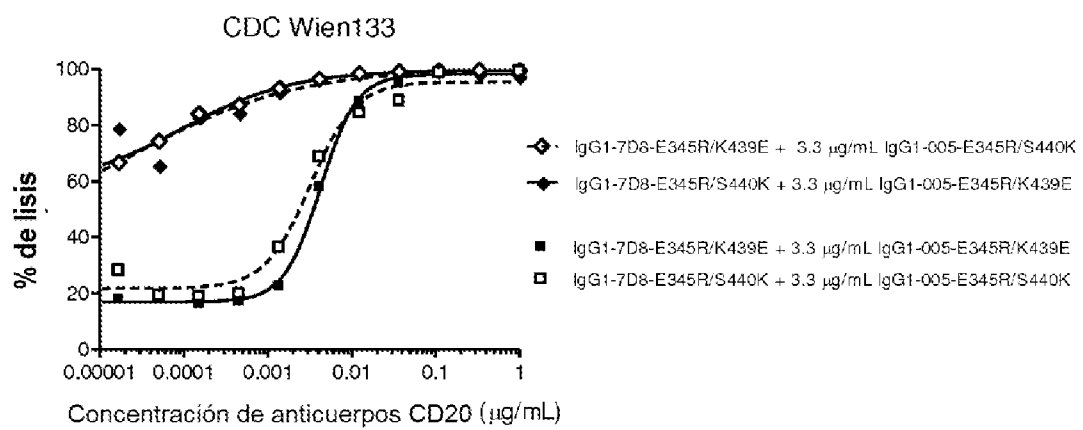


Figura 15A

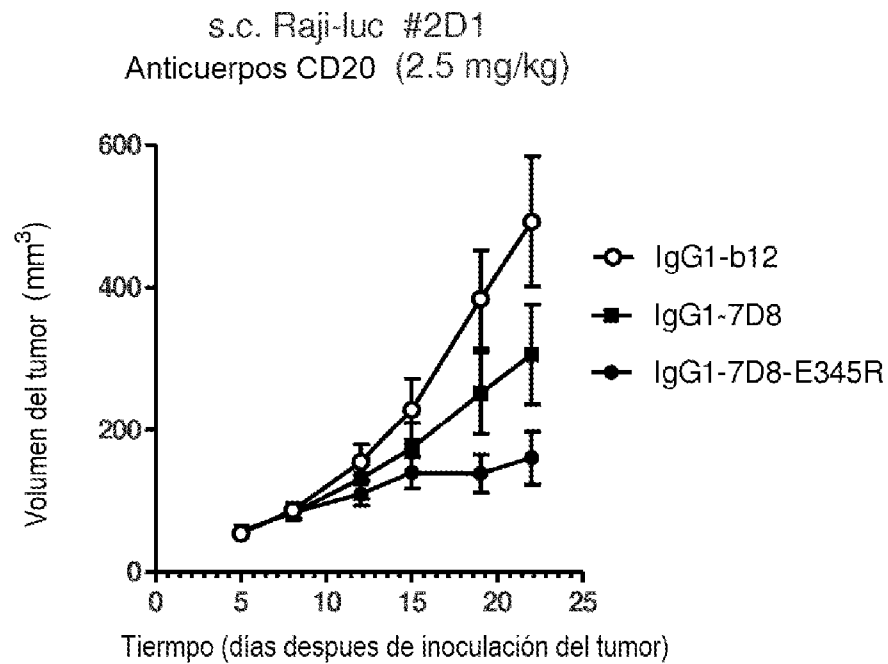


Figura 15B

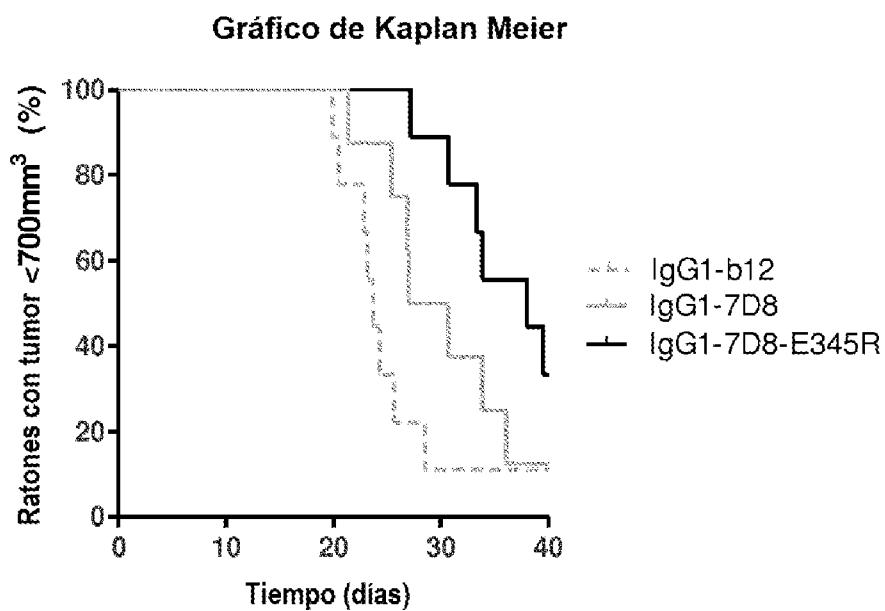


Figura 16A

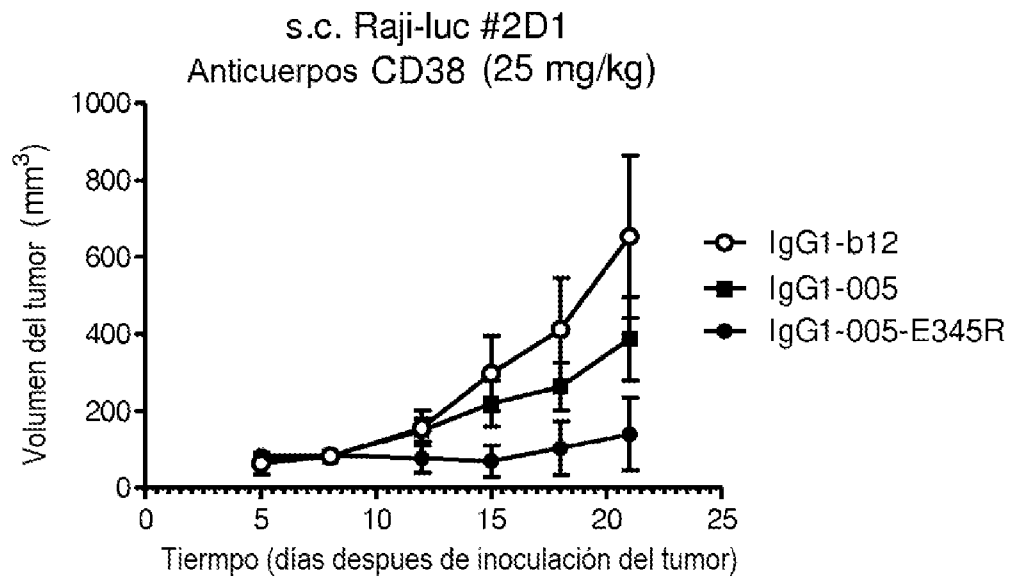


Figura 16B

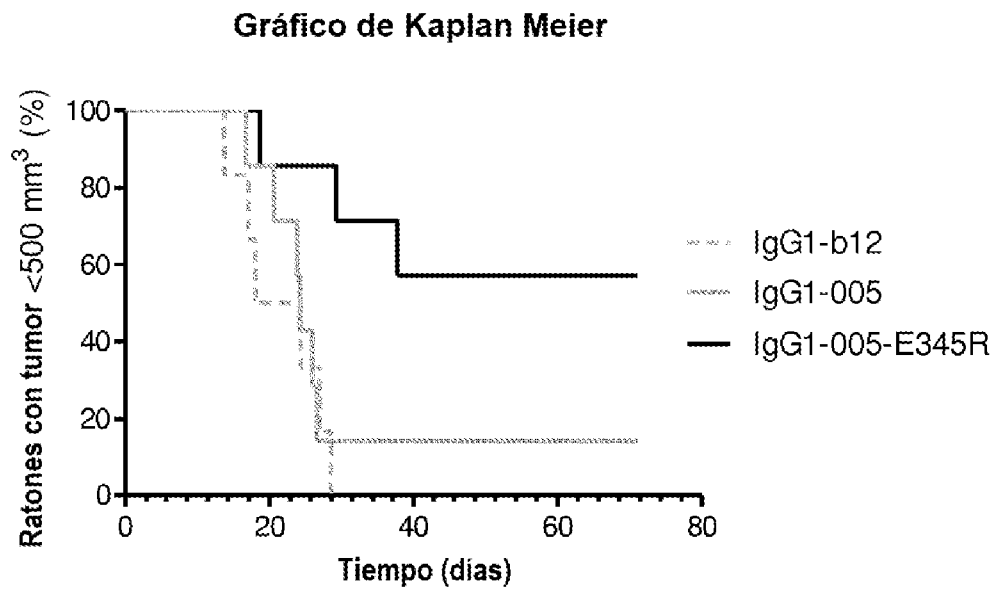


Figura 17

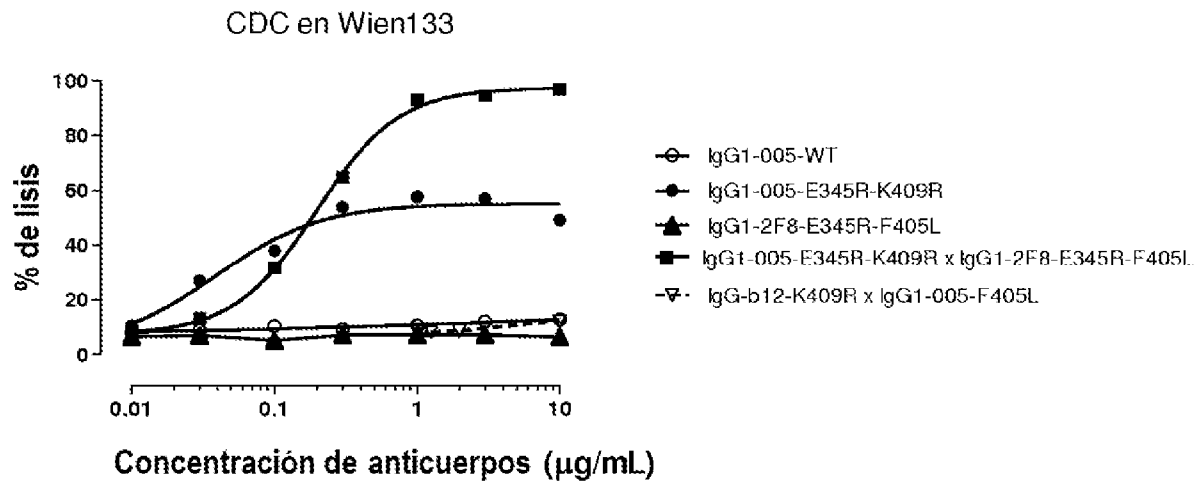


Figura 18A

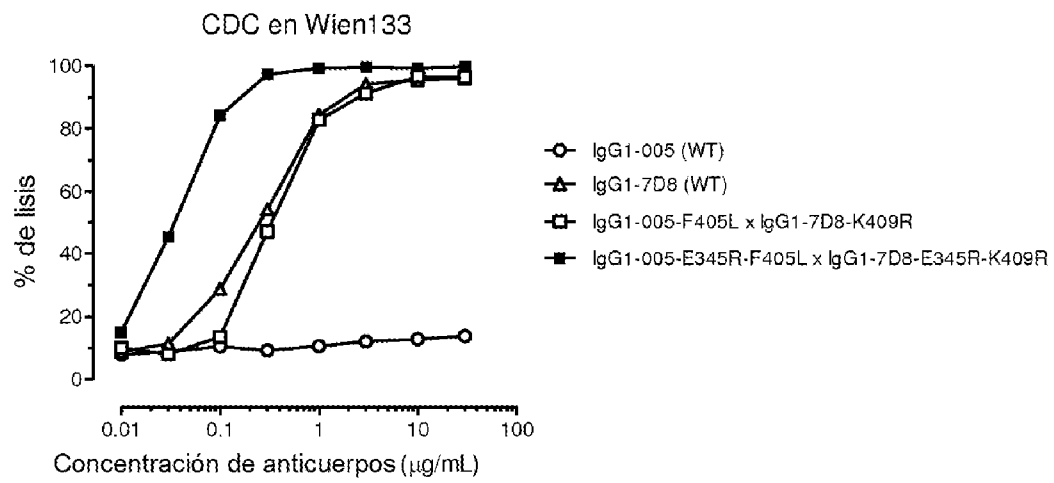


Figura 18B

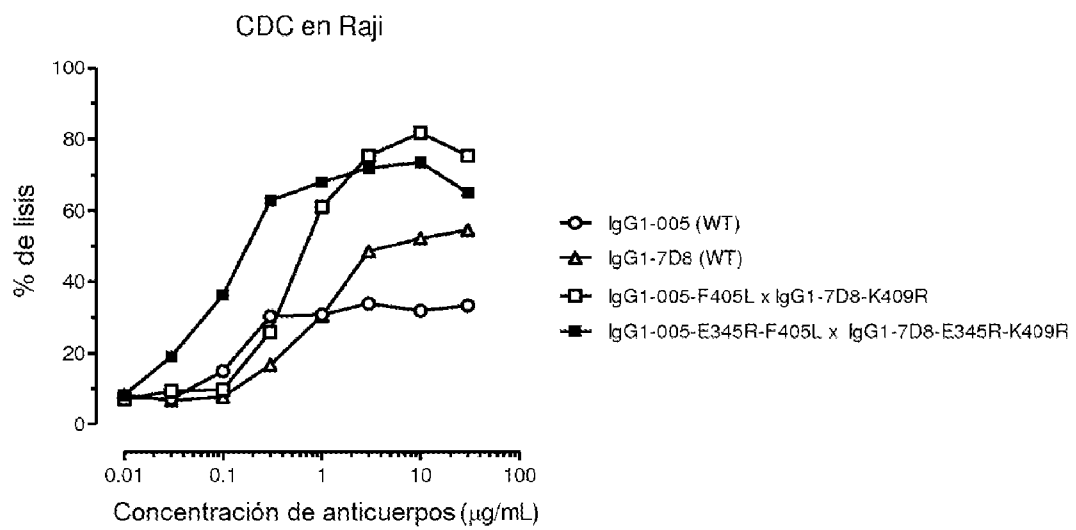


Figura 19

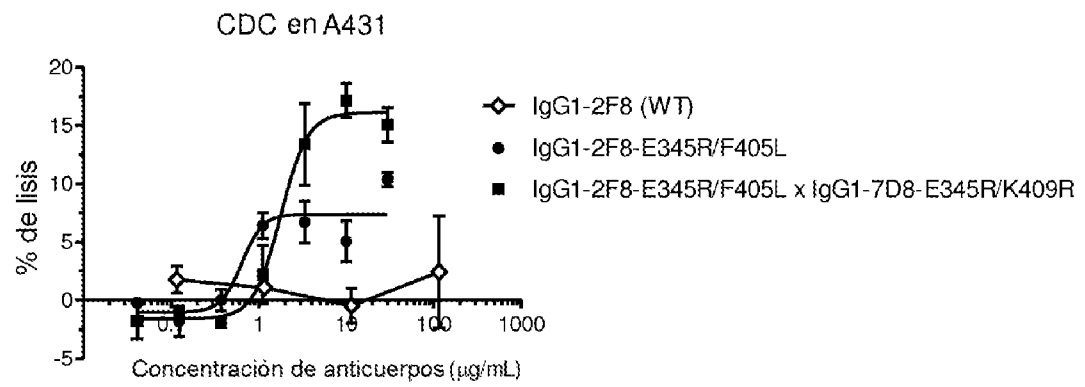


Figura 20

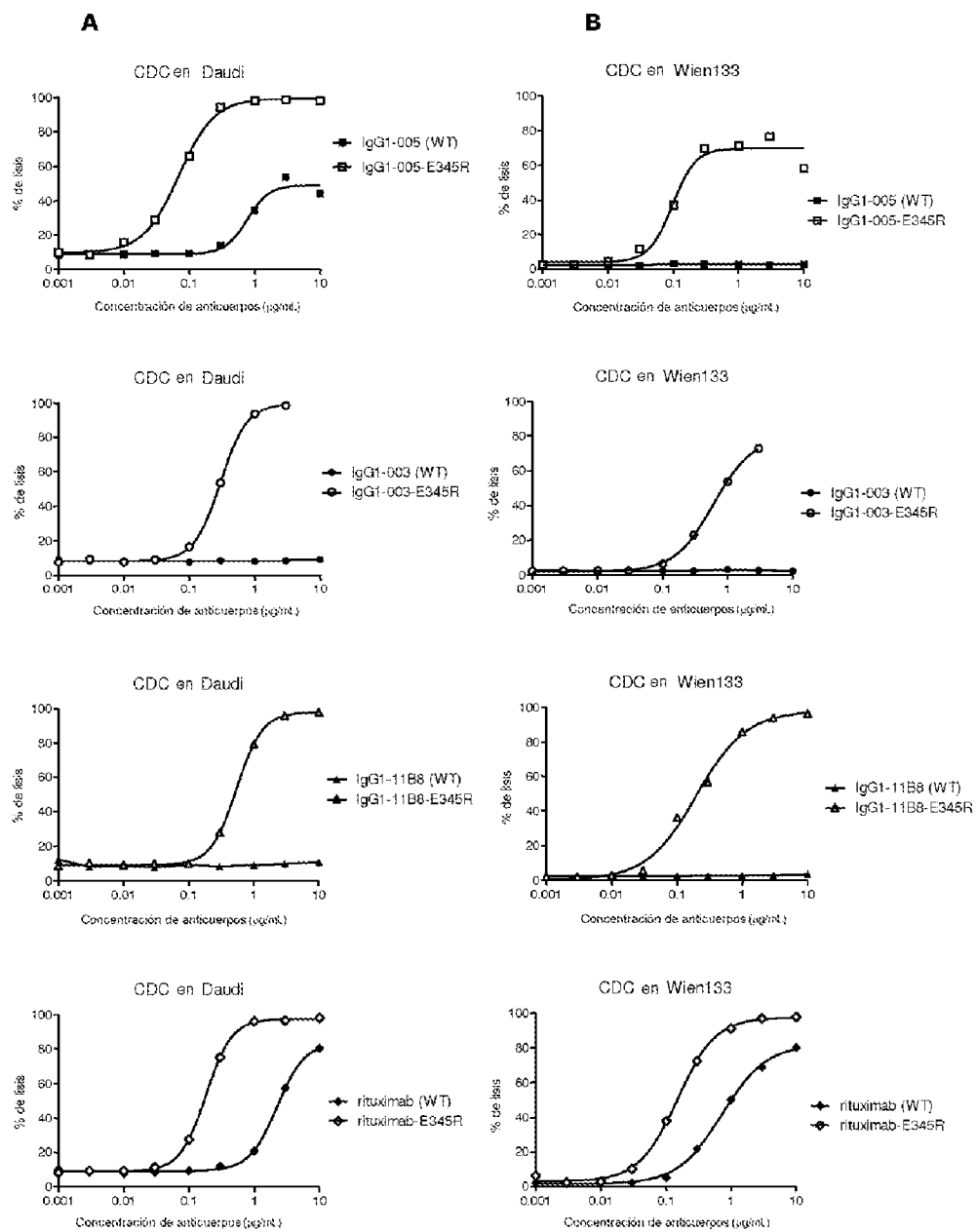


Figura 21

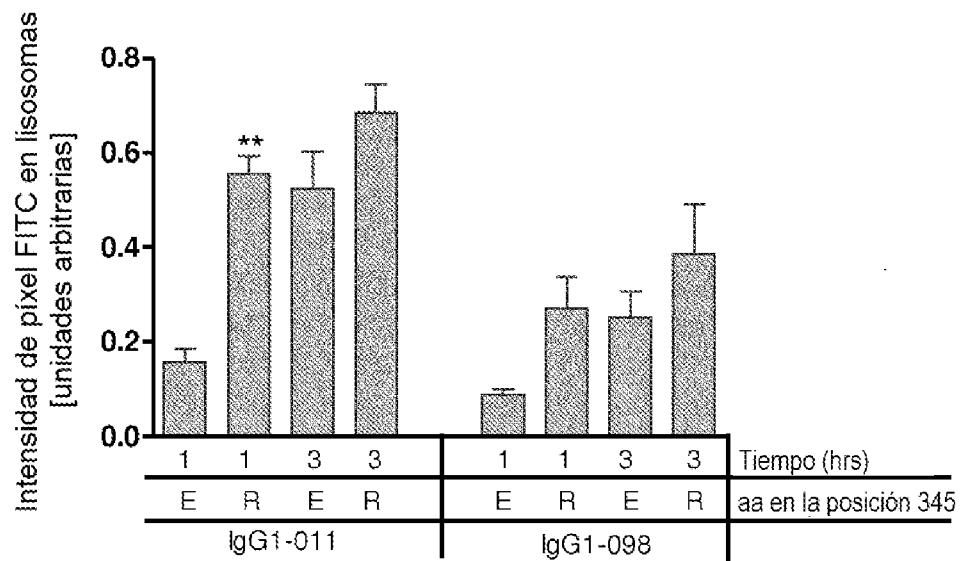


Figura 22A

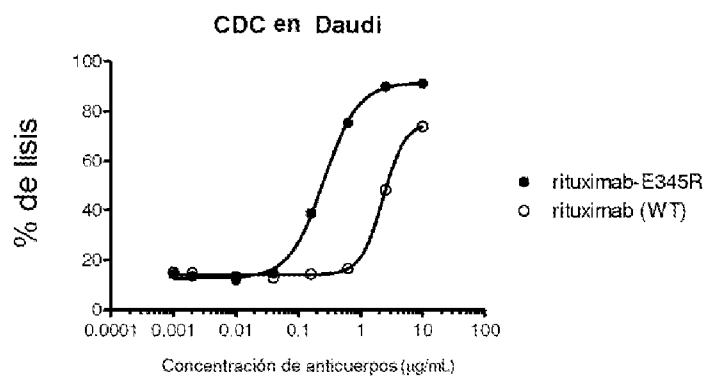


Figura 22B

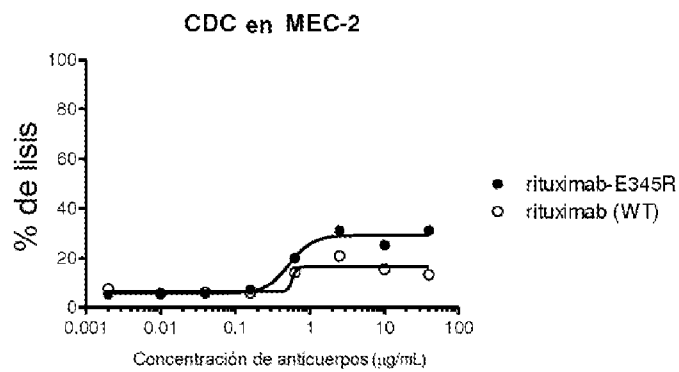


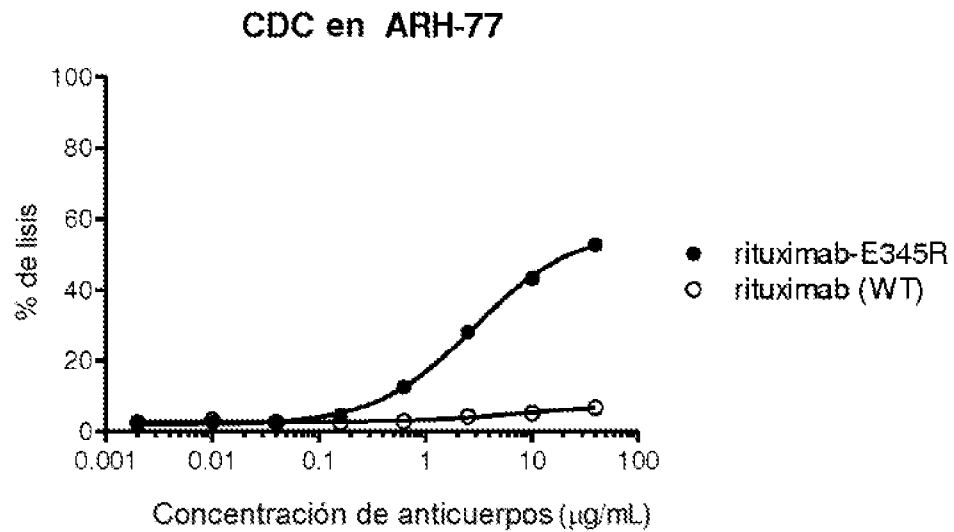
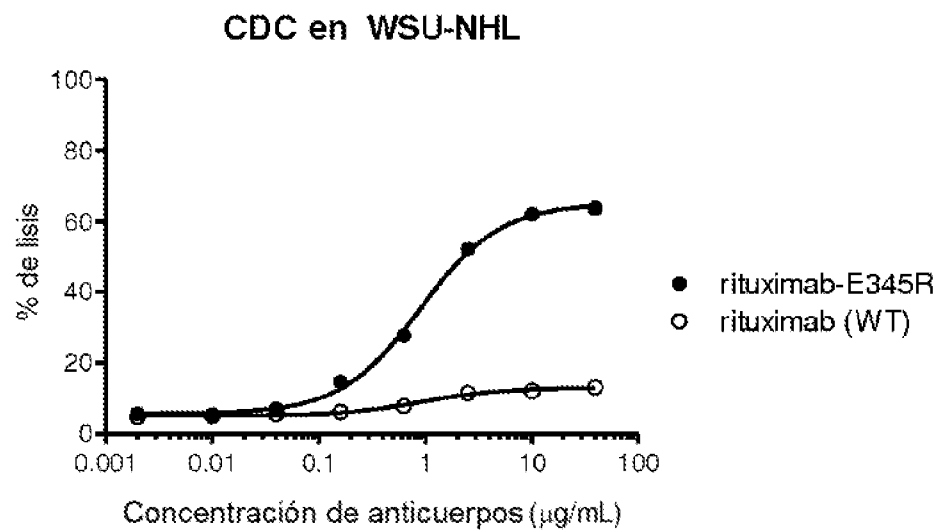
Figura 22C**Figura 22D**

Figura 22E

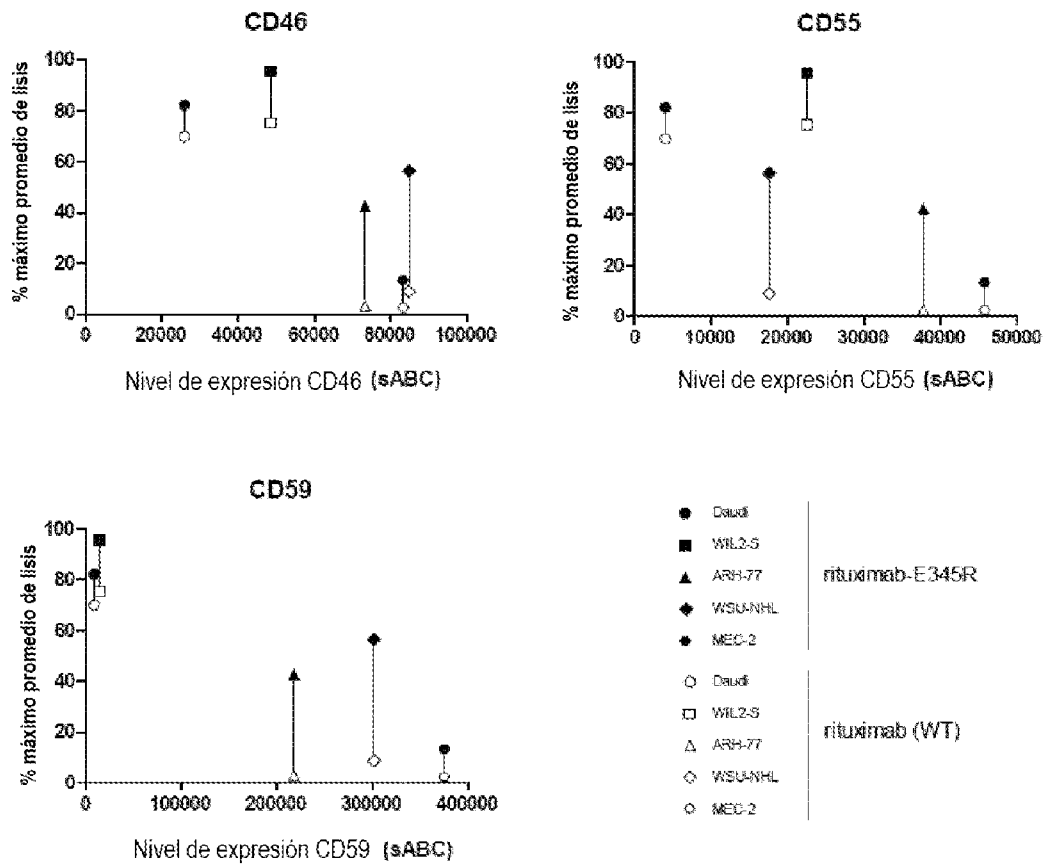
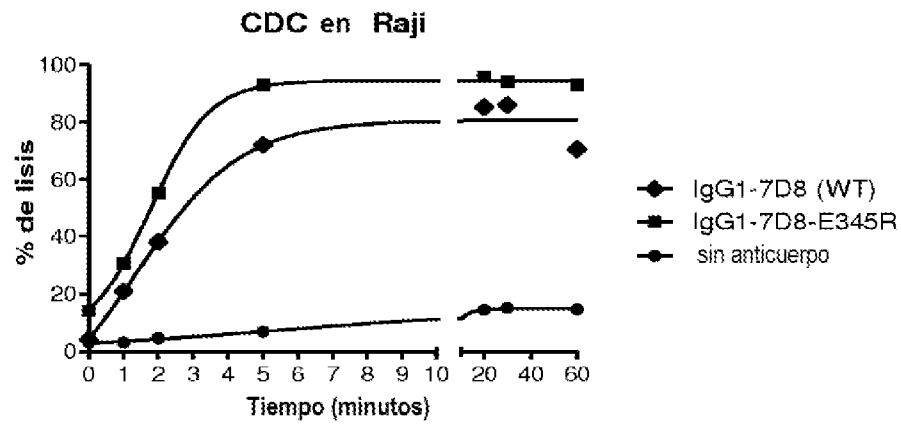
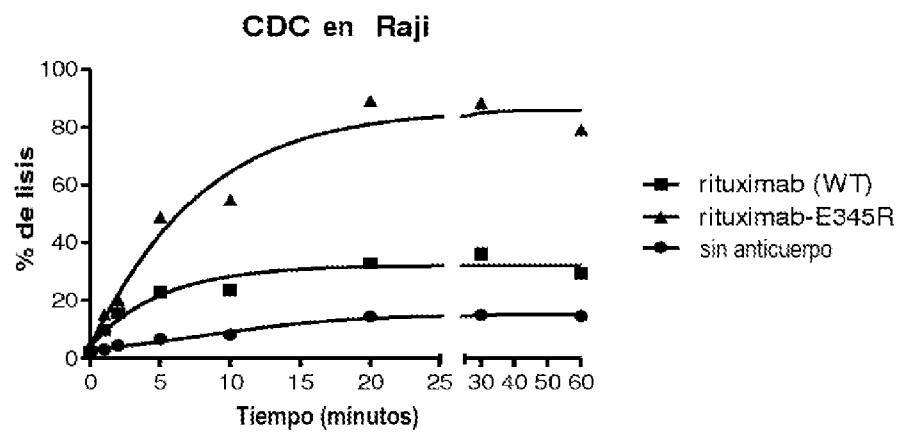


Figura 23

A



B



C

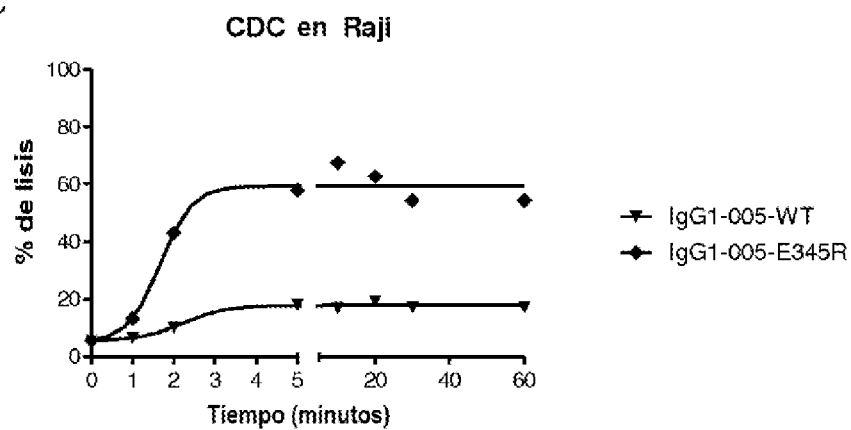


Figura 23 (cont.)

D

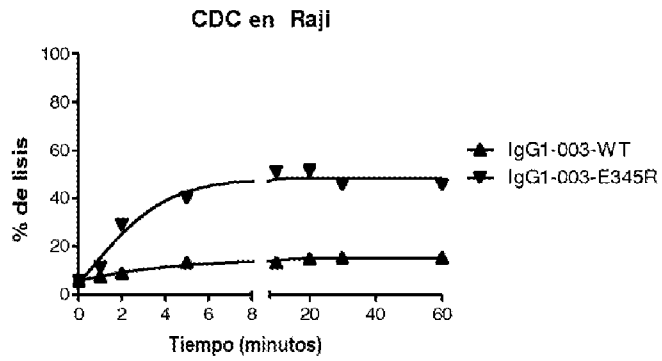


Figura 24

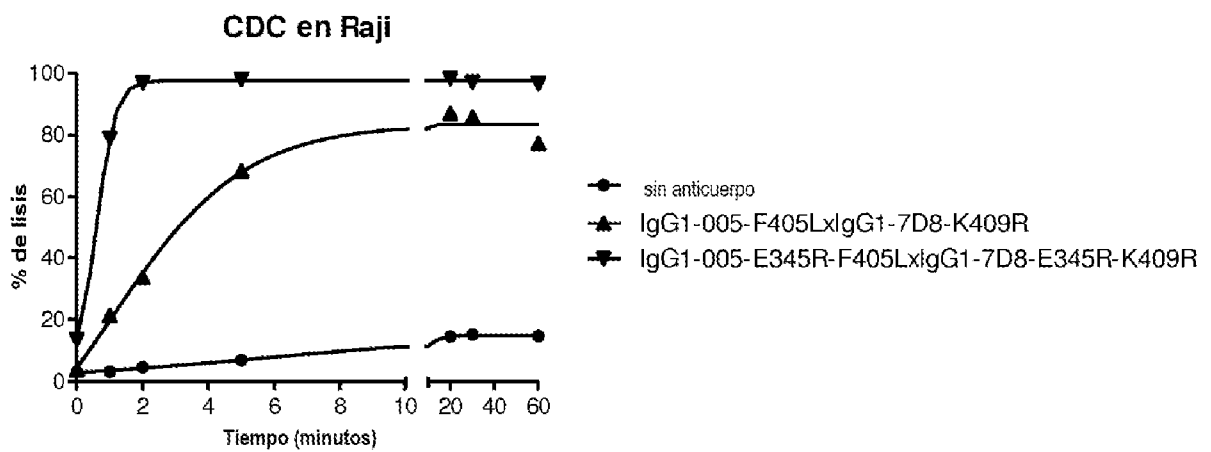


Figura 25

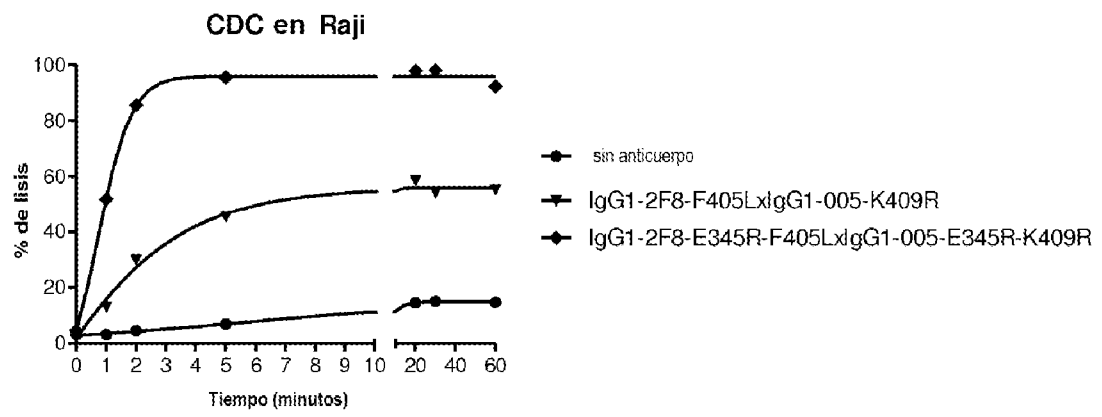


Figura 26

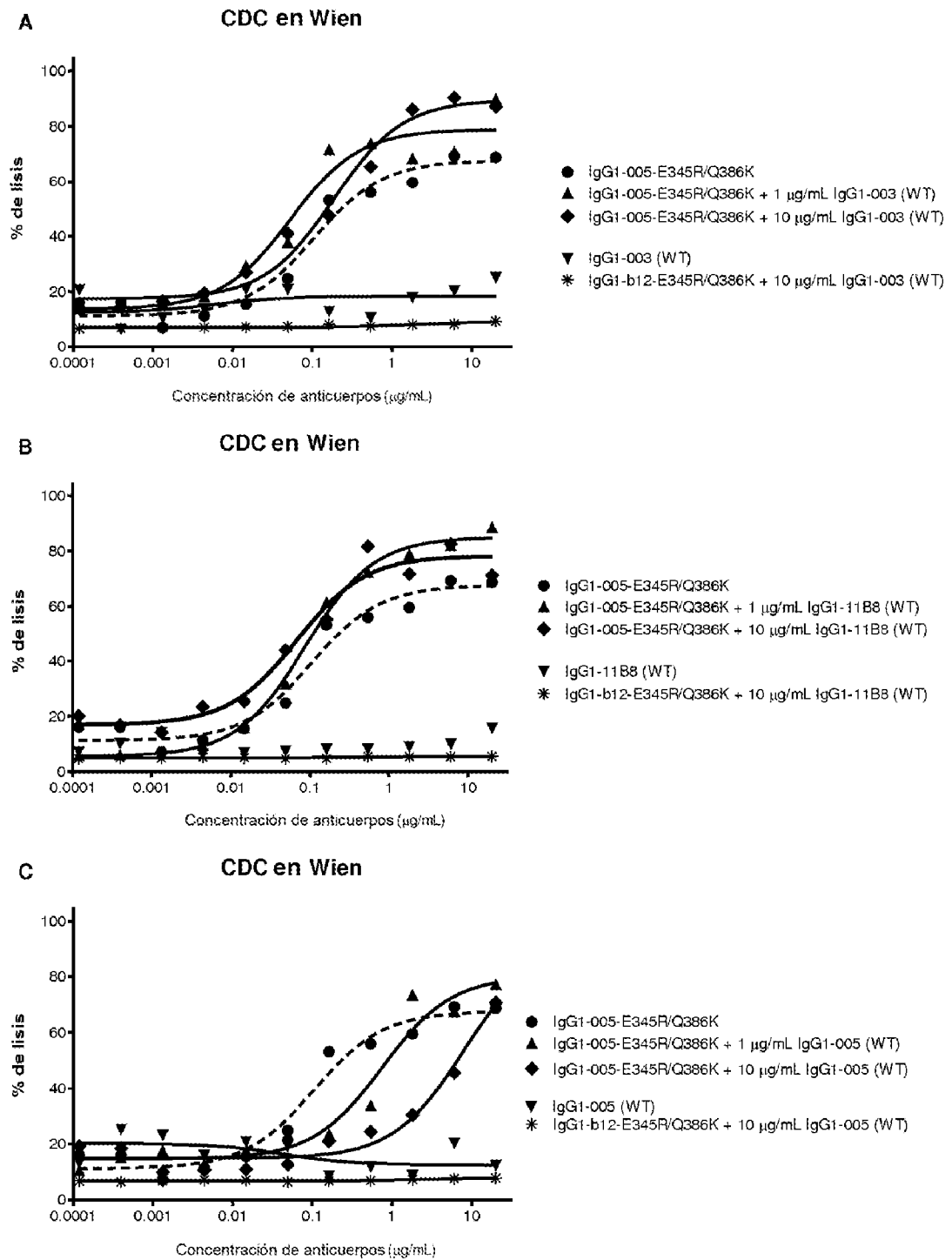


Figura 26 (cont.)

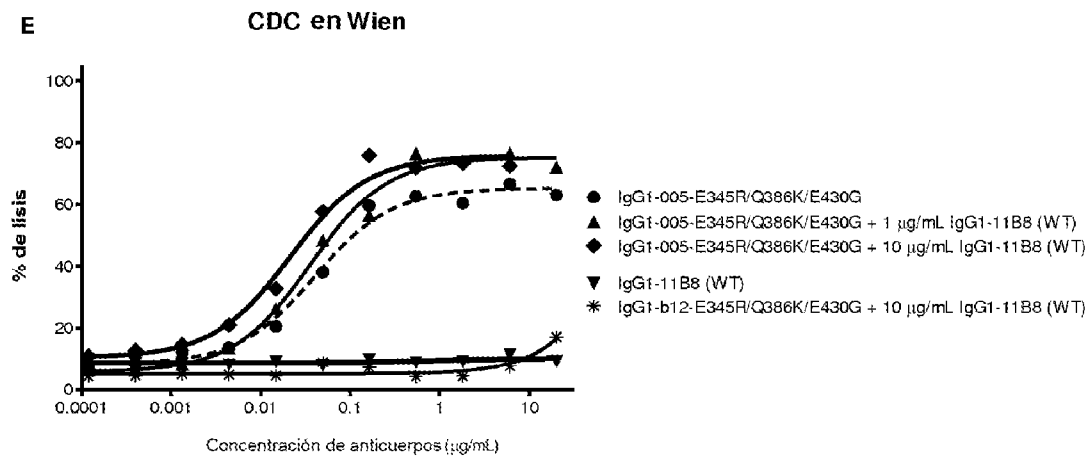
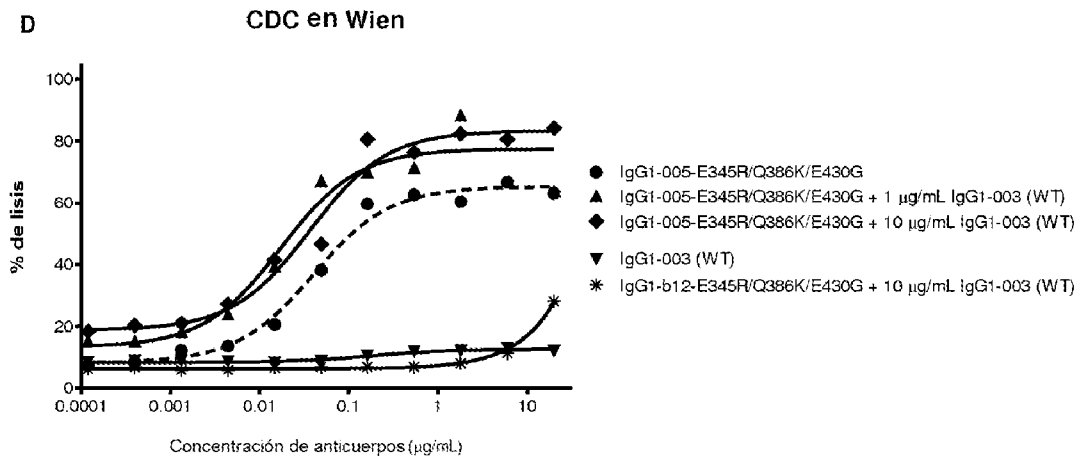


Figura 26 (cont.)

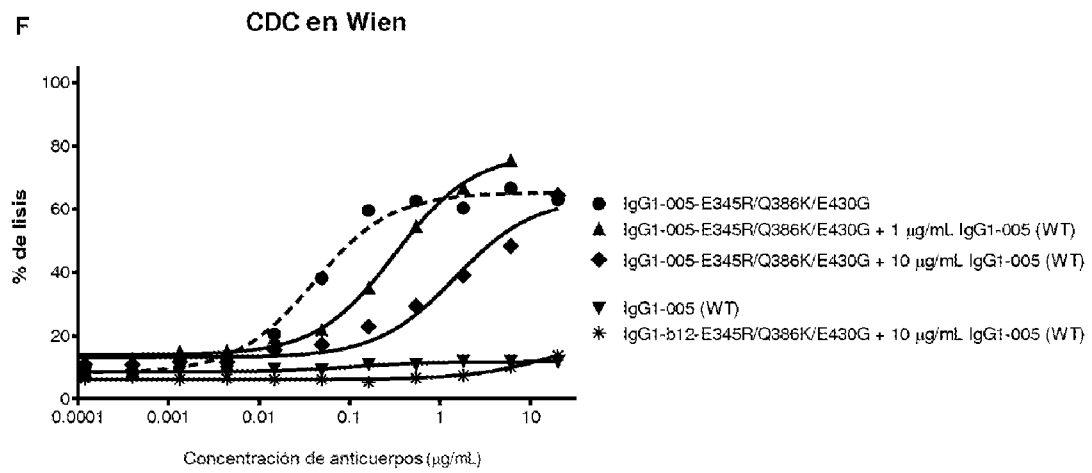


Figura 27

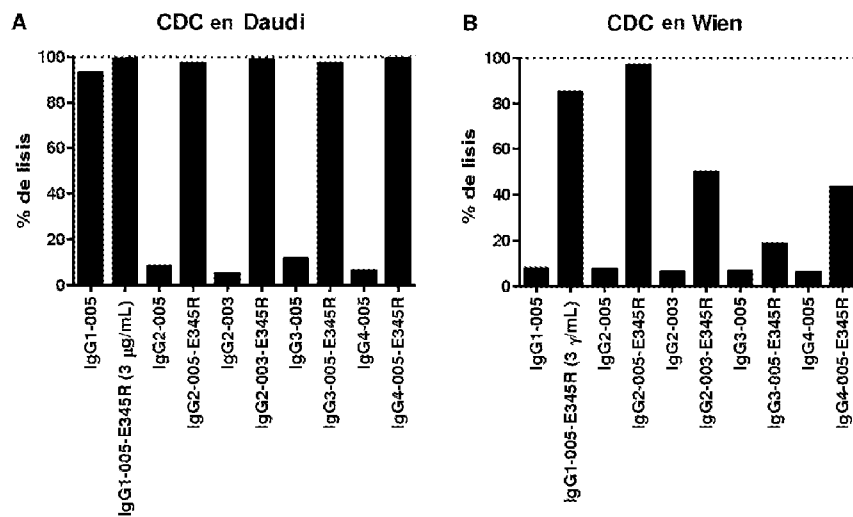


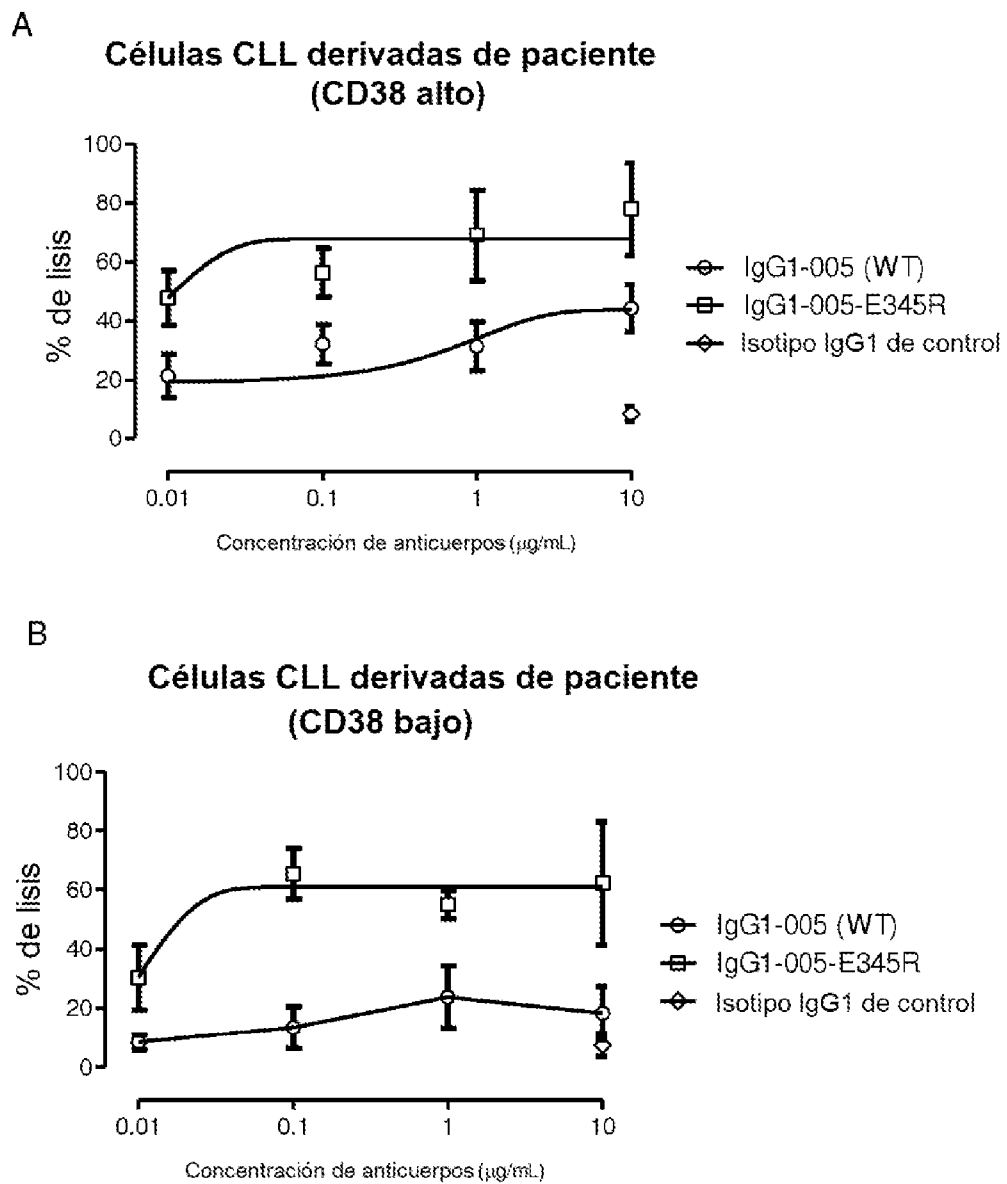
Figura 28

Figura 29

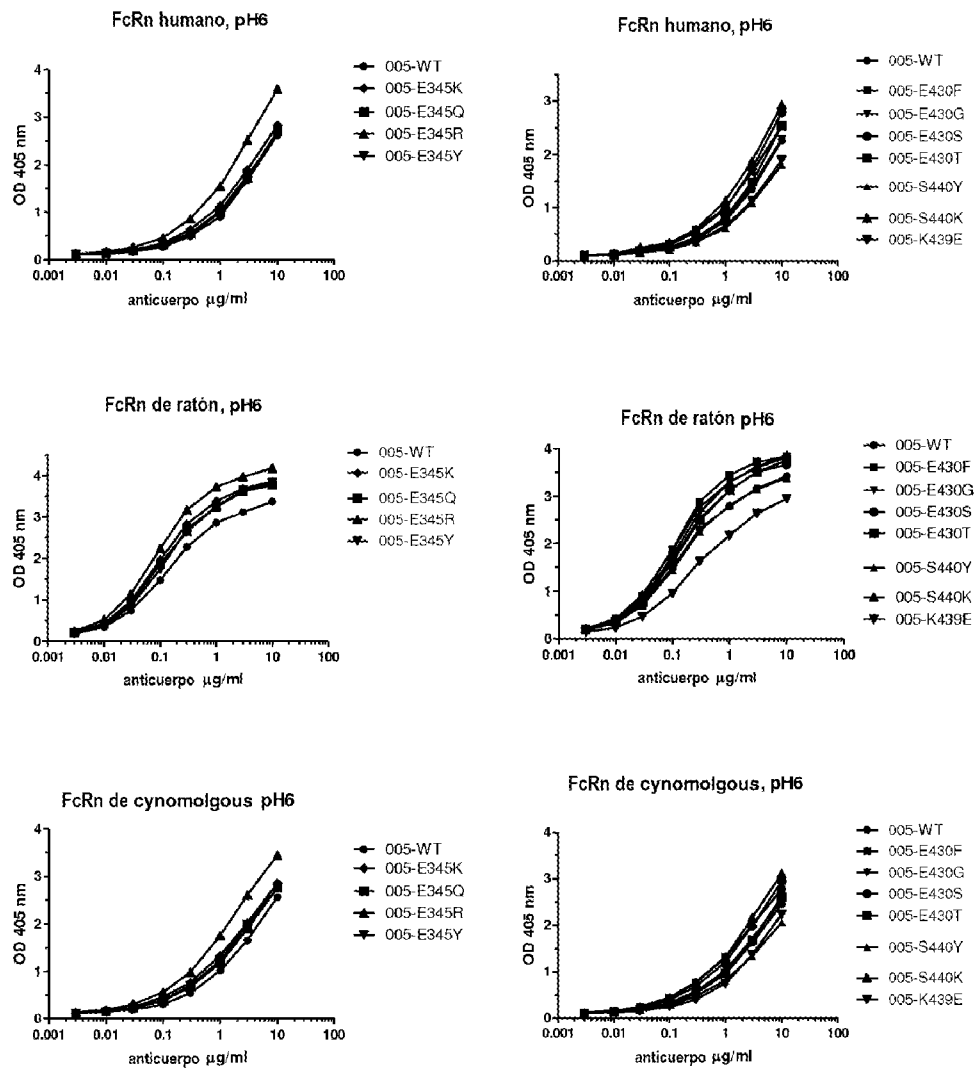


Figura 30

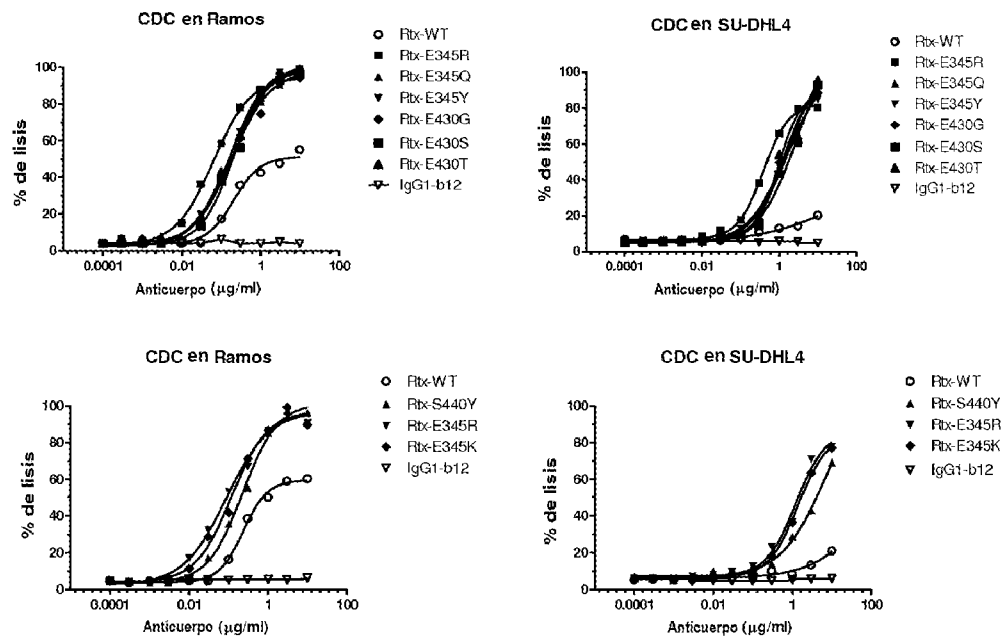


Figura 31

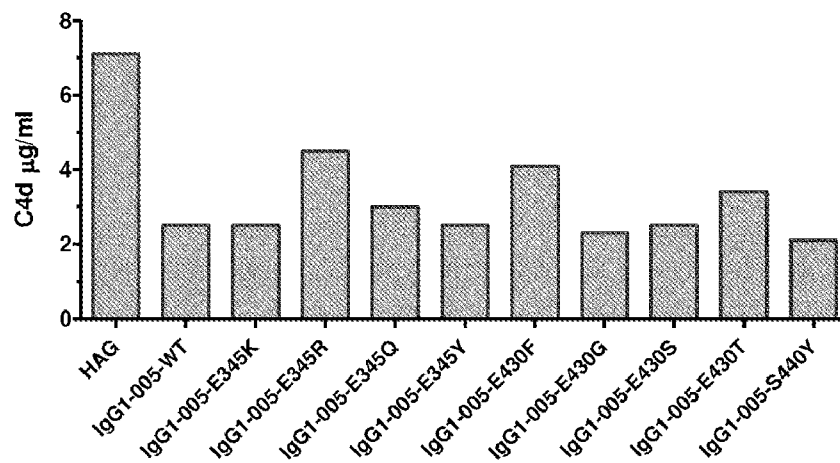


Figura 32A

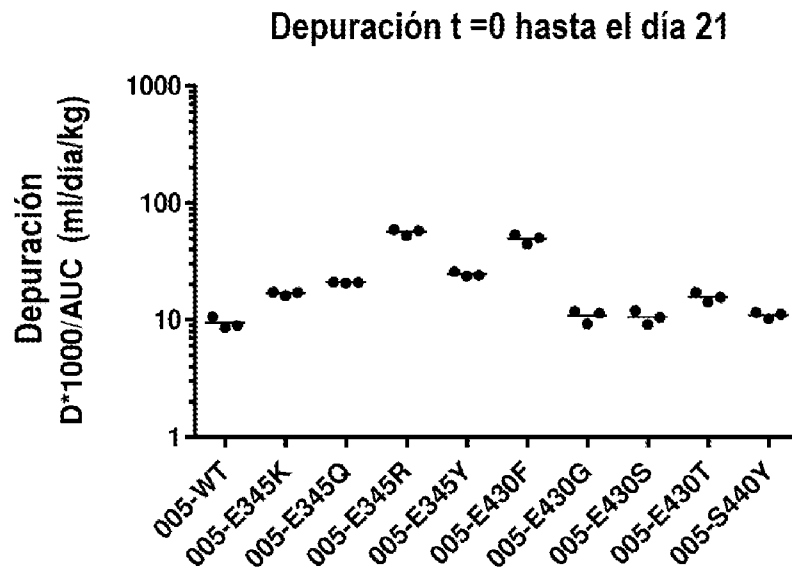


Figura 32B

